УДК 576.3:616-022.7
УКПП 72.11.11-00.00
№ ДР 0121U111199

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
«__» _____ 2021 р.

НАУКОВИЙ ЗВІТ ПРО РЕЗУЛЬТАТИ РЕАЛІЗАЦІЇ ПРОЄКТУ №2020.01/0044

«Протикоронавірусна активність водорозчинних C_{60} фулеренів у створенні нових прототипів профілактичних і терапевтичних препаратів: *in silico, in vitro* та *in vivo* скринінги»

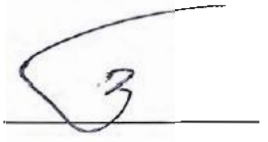
(заключний)

Науковий керівник НДР
д.ф.-м. н., проф. Прилуцький Ю.І.

2021

Результати роботи розглянуто Науково-технічною радою Київського університету імені Тараса Шевченка, протокол №10 від 09.12.2021 р.

СПИСОК АВТОРІВ

Науковий керівник д.ф.-м.н., проф.		Ю.І. Прилуцький (реферат, вступ, висновки, узагальнення результатів, розділ 2 (етап 1 (2020), розділ 3 (етап 1 (2021)), розділ 2 (етап 2 (2021)))
Старший науковий співробітник, д.б.н., с.н.с		С.В. Прилуцька (розділ 1 (етап 1 (2020), етап 1 і етап 2 (2021))
Старший науковий співробітник, к.ф.-м.н., с.н.с.		В.В. Черепанов (розділ 1 (етап 1 (2020), етап 1 і етап 2 (2021))
Старший науковий співробітник, к.б.н.		М.О. Платонов (розділ 2 (етап 1 (2020), етап 1 і етап 2 (2021))
Молодший науковий співробітник, к.б.н.		В.В. Гурмач (розділ 2 (етап 1 (2020) і етап 1 (2021)), розділ 3 (етап 2 (2021))
Інженер 1-ї категорії		Д.К. Завальний (розділ 1 (етап 1 (2020), етап 1 і етап 2 (2021))

РЕФЕРАТ

Звіт НДР: 64 с., 23 рис., 1 табл., 37 джерел.

C_{60} фулерен; коронавірус, протикоронавірусна активність; *in silico* скринінг

Об'єкт дослідження – взаємодія C_{60} фулерену з протеїнами-мішенями у складі коронавірусу SARS-CoV-2 (RdRp та 3CLpro) та рецепторним білком ACE2.

Мета роботи – з'ясування протикоронавірусної активності C_{60} фулерену.

Методи дослідження – сканувальна електронна мікроскопія, сканувальна тунельна мікроскопія, атомно-силова мікроскопія, динамічне розсіяння світла, молекулярна динаміка, молекулярний докінг.

Приготовлено та охарактеризовано водний розчин C_{60} фулеренів (C_{60}ВРФ) за використання оригінальної ультразвукової технології, мікроскопічних (СЕМ, СТМ, АСМ) та спектроскопічного (ДРС) методів. Так, результати ДРС засвідчили, що свіжоприготовлений C_{60}ВРФ (концентрація 0,15 мг/мл) є типовим колоїдним розчином, у якому переважно містяться сферичні наночастинки з гідродинамічним діаметром ~50 нм. Значення дзета-потенціалу для C_{60}ВРФ складало -27,0 мВ, що свідчить про його високу стабільність. Здійснено літературний пошук та відібрано активні протеїни-мішені у складі коронавірусу SARS-CoV-2 (RdRp та 3CLpro) та чутливих до них клітин різних органів (ACE2), здатних зв'язуватися із C_{60} фулереном. Здійснено дизайн потенційних комплексів «C_{60}-протеїн» в імітованому клітинному середовищі за використання методів молекулярної динаміки (МД) і докінгу. Показано, що C_{60} фулерен може утворювати стабільний комплекс з білком 3CLpro і, таким чином, пригнічувати функціональну активність SARS-CoV-2. Відповідно до результатів молекулярного докінгу C_{60} фулерен повністю заповнює відібрані сайти зв'язування протеїну RdRp. За результатами МД ключові взаємодії з RdRp зберігаються для усіх сайтів зв'язування. Для протеїнів 3CLpro і RdRp оцінено енергії зв'язування із C_{60} фулереном за використання методів MMPBSA та MMGBSA. Здійснено дизайн потенційних нанокластерів C_{60} фулерену у воді та проаналізовано їх здатність таргетувати протеїни RdRp та 3Clpro і, таким чином, пригнічувати функціональну активність коронавірусу SARS-CoV-2. Виявлено три потенційних сайти зв'язування між жолобком PD (пептидазний домен) рецепторного білка ACE2 і C_{60} фулереном, які характеризуються присутністю у своїй структурі амінокислот, здатних утворювати міцні стекінг або катіон-π взаємодії з окремим C_{60} фулереном або з таким у складі нанокластера. Відтак, C_{60} фулерен здатний пригнічувати функціональну активність ACE2, що важливо для блокування його взаємодії із S-протеїном SARS-CoV-2. Оцінено здатність C_{60} фулерену/його нанокластера проникати через ліпідну мембрану. Відповідно до результатів МД передбачається, що C_{60} фулерени у складі нанокластерів здатні утворювати пори в оболонці коронавірусу SARS-CoV-2, руйнуючи таким чином цілісність його структури, що веде до порушення мембранозалежних стадій циклу реплікації цього вірусу.

Результати впроваджено у навчальний процес ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

ABSTRACT

C_{60} fullerene; coronavirus, anticoronavirus activity; *in silico* screening

The object of the study is the interaction of C_{60} fullerene with target proteins in the SARS-CoV-2 coronavirus (RdRp and 3CLpro) and ACE2 receptor protein.

The aim of the study is to determine the anticoronaviral activity of C_{60} fullerene.

Research methods: scanning electron microscopy, scanning tunneling microscopy, atomic force microscopy, dynamic light scattering, molecular dynamics, molecular docking.

An aqueous solution of C_{60} fullerenes (C_{60}FAS) was prepared and characterized using original ultrasonic technology, microscopic (SEM, STM, AFM) and spectroscopic (DLS) methods. So, the DLS results showed that freshly prepared C_{60}FAS (concentration 0.15 mg/ml) is a typical colloidal solution, which mainly contains spherical nanoparticles with a hydrodynamic diameter ~50 nm. The value of the zeta potential for C_{60}FAS was -27.0 mV, which indicates its high stability. A literature search was performed and active target proteins in the SARS-CoV-2 coronavirus (RdRp and 3CLpro) and sensitive cells of various organs (ACE2) capable of binding to C_{60} fullerene were selected. The design of potential "C_{60}-protein" complexes in a simulated cellular medium was performed using the molecular dynamics (MD) and docking methods. It has been shown that C_{60} fullerenes can form a stable complex with the 3CLpro protein and thus inhibit the functional activity of SARS-CoV-2. According to the molecular docking results, C_{60} fullerene completely fills the selected binding sites of the RdRp protein. According to the MD results, key interactions with RdRp are retained for all binding sites. For 3CLpro and RdRp proteins, the binding energy to C_{60} fullerene was estimated using MMPBSA and MMGBSA methods. The design of potential C_{60} fullerene nanoclusters in water was performed and their ability to target RdRp and 3Clpro proteins and thus inhibit the functional activity of SARS-CoV-2 coronavirus was analyzed. Three potential binding sites between the PD (peptidase domain) of the ACE2 protein and C_{60} fullerene have been identified, which are characterized by the presence in their structure of aminoacids capable of forming strong stacking or cation-π interactions with a single C_{60} fullerene or its nanocluster. Thus C_{60} fullerene is able to inhibit the functional activity of ACE2, which is important for blocking its interaction with S-protein of SARS-CoV-2. The ability of C_{60} fullerene/its nanocluster to penetrate the lipid membrane was evaluated. According to the MD results, it is assumed that C_{60} fullerene nanoclusters are able to form pores in the shell of the SARS-CoV-2 coronavirus, thus destroying the integrity of its structure, that leads to disruption of membrane-dependent stages of the replication cycle of this virus.

ЗМІСТ

Скорочення та умовні познаки. . …….. 7
Вступ 8
Етап 1 (2020 р.) 11
1 Приготування та характеризування водного колоїдного розчину C_{60} фулерену (C_{60}ВРФ).....
1.1 Приготування C_{60}ВРФ заданої концентрації та його первинне характеризування спектроскопічними методами..... 11
1.2 Дослідження структурної самоорганізації C_{60}ВРФ залежно від концентрації (форма та розмір частинок) за використання спектроскопічного методу (ДРС). 12
1.3 Дослідження структурної самоорганізації C_{60}ВРФ залежно від концентрації (форма та розмір частинок) за використання мікроскопічного методу (АСМ) 15
2 Дизайн комплексів «C_{60}-протеїн» . . . . . .
2.1 Пошук активних протеїнів-мішеней у складі досліджуваних коронавірусів, включаючи і SARS-CoV-2, та чутливих до них клітин різних органів, здатних зв'язуватися із C_{60} фулереном..... 16
2.2 Дизайн оптимально можливих комплексів «C_{60}-протеїн» в імітованому клітинному середовищі за використання методу молекулярної динаміки та докінгу..... 19
Висновки 21
Перелік джерел посилання 22
Етап 1 (2021 р.) 23
1 Приготування та характеризування водорозчинних C_{60} фулеренів.....
1.1 Приготування водного колоїдного розчину C_{60} фулерену (C_{60}ВРФ) заданої концентрації та його первинне характеризування спектроскопічними методами..... 23
1.2 Дослідження структурної самоорганізації C_{60}ВРФ залежно від концентрації (розподіл частинок за розміром, індекс полідисперсності та значення дзета-потенціалу) за використання спектроскопічного методу (ДРС). 24
1.3 Дослідження структурної самоорганізації C_{60}ВРФ залежно від концентрації (форма та розмір частинок) за використання мікроскопічних методів (СЕМ, АСМ і СТМ) 26
2 Оцінка стабільності одержаних комплексів «C_{60}-протеїн» в імітованому клітинному середовищі методами молекулярної динаміки і докінгу..... 32
3 Дизайн нанокластера C_{60} фулерену та оптимально можливих комплексів між ним і протеїнами-мішенями за використання методу молекулярної динаміки..... 37
Висновки 40

Перелік джерел посилання 41
Етап 2 (2021 р.) 42
1 Приготування та характеризування водного колоїдного розчину C_{60} фулерену (C_{60}ВРФ).....
1.1 Приготування C_{60}ВРФ заданої концентрації та його первинне характеризування спектроскопічними методами (УФ-Вид і КРС) 42
1.2 Дослідження структурної самоорганізації C_{60}ВРФ залежно від концентрації (розмір частинок та значення дзета-потенціалу) за використання спектроскопічного методу (ДРС) 43
1.3 Дослідження структурної самоорганізації C_{60}ВРФ залежно від концентрації (форма та розмір частинок) за використання мікроскопічних методів (СЕМ, АСМ і СТМ) 46
2 Оцінка стабільності одержаних комплексів «C_{60} нанокластер - протеїн» в імітованому клітинному середовищі методами молекулярної динаміки і докінгу .....
2.1 Дослідження структурної організації рецепторного білка ACE2 за використання методу молекулярної динаміки 51
2.2 Дослідження взаємодії C_{60} фулерену з білком ACE2 за допомогою методів молекулярної динаміки і докінгу 52
3 Оцінка проникності C_{60} фулерену/його нанокластера крізь ліпопротеїнову оболонку коронавіруса за використання методу молекулярної динаміки..... 56
Висновки 58
Перелік джерел посилання 60
Узагальнення результатів 62

Скорочення та умовні познаки

АСМ – атомно-силова мікроскопія

ДРС – динамічне розсіяння світла

МД – молекулярна динаміка

СЕМ - сканувальна електронна мікроскопія

СТМ - сканувальна тунельна мікроскопія

C_{60}ВРФ - водний колоїдний розчин C_{60} фулерену

ACE2 – ангіотензин-перетворюючий фермент 2; рецепторний білок, який кодується геном *ACE2,* сприяє зв'язуванню коронавіруса SARS-CoV-2 з поверхнею клітин

COVID-19 - абревіатура від англ. *Coronavirus disease 2019; з*атверджена ВООЗ назва хвороби - коронавірусна хвороба 2019

DMSO - диметилсульфоксид

ЕТС - ембріональна сироватка теляти

PD - пептидазний домен

RdRp - абревіатура від англ. RNA-dependent RNA polymerase - РНК-залежна РНК полімераза

SARS-CoV-2 – абревіатура від англ. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* - новий коронавірус 2019 (2019-nCoV) - одноланцюговий РНК-вмісний штам виду SARSr-CoV родини β-коронавірусів

3CLpro - абревіатура від англ. 3-chymotrypsin-like protease - 3-хімотрипсин-подібна протеаза

Вступ

Спалахи інфекційних захворювань є загрозою, перед якою людство за умов глобалізації суспільства постає усе частіше. Через високу мобільність населення завдяки розвиненому транспортному сполученню особливо небезпечні інфекційні захворювання поширюються доволі швидко. Наразі вірусні інфекції становлять переважну частину інфекційної патології людини і тварин. Щорічно вони призводять до значних втрат практично у всіх вікових і соціальних групах населення і тваринницькій галузі. Нинішня пандемія COVID-19 спричинена новим коронавірусом SARS-CoV-2, який відноситься до тієї ж групи, що і добре відомі SARS і MERS - збудники атипової пневмонії і близькосхідної лихоманки.

Коронавіруси - найбільша група вірусів, що належать до порядку *Nidovirales.* Їх поділяють на чотири групи: α, β, γ і Δ. Характерною рисою коронавірусів є широкий спектр їх природних господарів у поєднанні з вираженим видовим обмеженням патогенності. За здатністю вражати різні органи коронавіруси можуть бути віднесеними до пантропних вірусів, які інфікують епітелій слизових оболонок кишечника, дихальних шляхів, нервові клітини, викликаючи печінкові, ентеротропні, пневмотропні та нейротропні захворювання різного ступеня тяжкості. При порівнянні коронавірусів тварин, що є представниками різних груп (вірус трансмісивного гастроентериту свиней - TGEV, вірус великої рогатої худоби (ВРХ) - BCoV та вірус інфекційного бронхіту курей (ІБК) - IBV), виявлено, що α- і β-коронавіруси (TGEV та BCoV) утворюють кластери частинок з подвійною мембраною (DMV), яка є досить консервативною серед коронавірусів, іноді це пов’язано із звивистою формою мембрани. Водночас γ-коронавірус IBV індукує широкі парні мембрани та менші 60-80 нм сфери на додаток до DMV. За винятком філогенезу досліджуваних коронавірусів, єдиною відомою характеристикою, яка відрізняє віруси свиней (TGEV) та великої рогатої худоби (BCoV), є їх унікальний неструктурний протеїн 1 (nsp1), різний за розміром і послідовністю, а також відсутність nsp1 в IBV. Крім того, гомології геному BCoV порівняно з IBV та TGEV становлять лише 48,3% та 53%, відповідно. Тому дослідження з розробки нових противірусних препаратів мають

базуватися на моделях коронавірусів, що належать до різних груп. Оскільки вірус SARS-CoV-2 належить до групи β-коронавірусів, ми вважаємо доцільним проведення досліджень на модельних апатогенних для людини вірусах тварин - прототипах збудників COVID-19, що відносяться до тієї ж генетичної групи. Відомо, що внаслідок унікального механізму вірусної реплікації, коронавіруси мають високу тенденцію до рекомбінації та частоту мутацій (наприклад, поява нового штаму «Дельта плюс», Індія, квітень 2021р.), що потенційно збільшує можливість їх адаптації до нових господарів та екологічних ніш, що необхідно враховувати при моделюванні досліду.

Спалахи SARS, MERS та Covid-19 стимулювали до дослідження їх збудників, за результатами яких було виявлено велику кількість відповідних антивірусних мішеней, таких як вірусні протеази, полімерази та внутрішні білки коронавірусів. Вважають, що війчасті і келихоподібні епітеліальні клітини, які вкривають носову порожнину, є основними мішенями потрапляння віруса SARS-CoV-2 в організм людини. Саме ці клітини містять високий рівень білків ACE2, на яких коронавірус адсорбується (прикріплюється) за допомогою специфічних білків оболонки. За інфікування білковий шип на поверхні віріона SARS-CoV-2 також прикріплюється до білка-рецептора клітин легені людини, зокрема ACE2, і проникає всередину органу. Віруси SARS-CoV (2002-2003рр.) та SARS-CoV-2 (2020р.) здатні проникати всередину макрофагів і дендритних клітин, однак у цьому випадку спостерігається лише абортивна інфекція. У хворих на COVID-19 виявлено аномальне зменшення кількості імунокомпетентних клітин та пригнічення їх функціональної активності. Відтак проблема нейтралізації активності коронавірусу потребує детального вивчення його структурної організації - складових частин, особливо тих, які беруть участь у взаємодії з клітинами-мішенями різних органів людей (у зв'язуванні та проникненні) та механізмах розмноження вірусу в клітині-мішені. Володіючи такою важливою інформацією, можна запропонувати ефективні профілактичні і терапевтичні препарати, які будуть перешкоджати або потраплянню коронавірусу в клітини-мішені, або його розмноженню в них. З іншого боку, можна визначити ті

структурні елементи коронавірусу, які будуть найкращим чином викликати імунну відповідь в організмі людини на його проникнення, що є основою для створення ефективних противірусних вакцин.

У цьому контексті привабливими є нанорозмірні вуглецеві молекули - C_{60} фулерени (діаметр 0,72 нм) внаслідок їх біосумісності, біодоступності та високої біологічної активності у системах *in vitro* та *in vivo*. Завдяки специфічній взаємодії з молекулярними мішенями, потужним антиоксидантним властивостям, здатності виступати таргетними носіями ліків, вони проявляють протизапальну, антибактеріальну, протипухлинну, нейро- та радіопротекторну дії, слугують інгібіторами ферментів, векторами для доставки ліків, контрастними агентами для МРТ і фотодинамічної терапії, а також, що важливо, противірусну та імуномодулюючу дії. Тому проведення модельних (*in silico* скринінг) досліджень C_{60} фулеренів як потенційних профілактичних і терапевтичних засобів проти коронавірусу SARS-CoV-2, що несе загрозу життю людини, є вкрай актуальним.

In vitro та *in vivo* скринінги протикоронавірусної активності водорозчинних C_{60} фулеренів були проведені субвиконавцями проєкту – співробітниками Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) в умовах лабораторії з рівнем біологічної безпеки BSL-2 на модельних апатогенних для людини вірусах тварин - прототипах збудників COVID-19, що відносяться до тієї ж генетичної групи (звіт додається).

Етап 1 (2020 р.): Дизайн комплексів «C_{60}-протеїн», приготування і характеризування водного колоїдного розчину C_{60} фулерену (C_{60}ВРФ)

1. Приготування та характеризування водного колоїдного розчину C_{60} фулерену (C_{60}ВРФ)

1.1 Приготування C_{60}ВРФ заданої концентрації та його первинне характеризування спектроскопічними методами

Метод отримання C_{60} фулеренів базується на спалюванні графітового стержня у дузі постійного струму в атмосфері гелію за температури 6000 ^{0}C. Подальше очищення C_{60} фулеренів здійснювали за допомогою методу гель-хроматографії з використанням як елюєнта толуолу та високоефективної рідинної хроматографії (Jasco PU-2086, ФРН). Органічний розчинник видаляли шляхом випаровування у вакуумі. Після цього до суміші очищених C_{60} фулеренів (чистота складала >99,5%) додавали дистильовану воду. Для одержання водного розчину C_{60} фулерену (C_{60}ВРФ) з рівномірним розподілом молекул C_{60} його обробляли ультразвуком (частота 8 Гц, тривалість 8 год) [1]. Отриманий темно-коричневий водний розчин C_{60} фулерену (концентрація 0,15 мг/мл або 208 мкМ) є типовою молекулярно-колоїдною системою, яка стабільна упродовж 18 місяців у діапазоні температур +4-25 ^{0}C. До складу цього розчину стабілізатори не входять. Важливо також підкреслити, що поверхневе гідроксилювання молекул C_{60} (поява ОН групи біля атома вуглецю, тобто формування наноструктури $C_{60}(OH)_n$) є найбільш ймовірним механізмом їх стабілізації у водному розчині [2].

Первинне характеризування C_{60}ВРФ здійснено спектроскопічними методами (УФ-Вид і КРС – комбінаційне розсіяння світла), які підтвердили присутність молекул C_{60} у воді [3]. Так, C_{60} фулерену притаманне інтенсивне оптичне поглинання світла у діапазоні дальнього (220 нм) та ближнього (265 та 345 нм) ультрафіолету та менш інтенсивне у видимому (450 та 600 нм) діапазоні (Рис. 1.1).

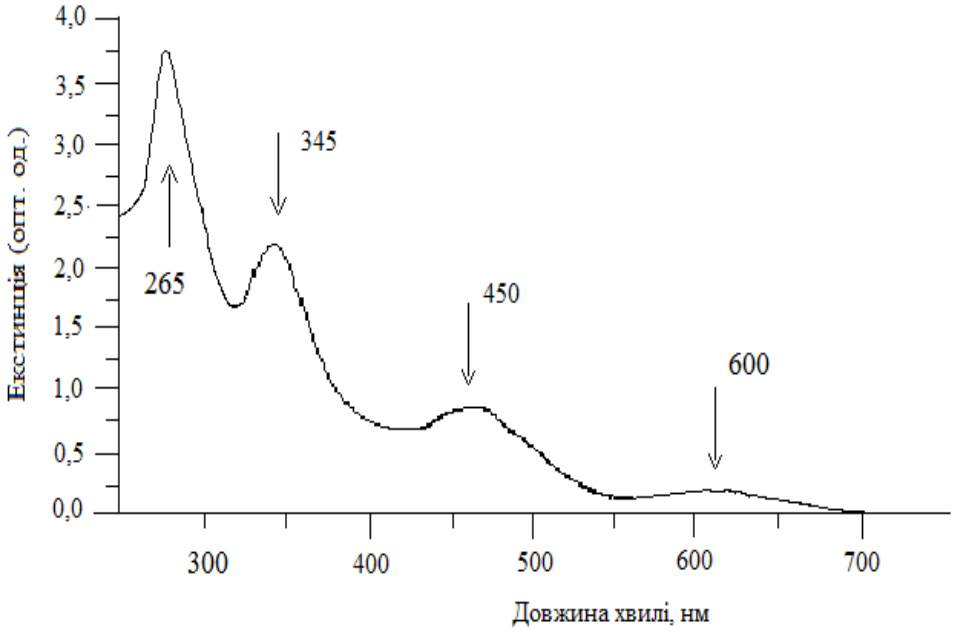


Рисунок 1.1. - Спектр оптичного поглинання C_{60} фулерену у водному колоїдному розчині заданої концентрації 0,15 мг/мл.

1.2 Дослідження структурної самоорганізації C_{60}ВРФ залежно від концентрації (форма та розмір частинок) за використання спектроскопічного методу (ДРС)

Застосування C_{60} фулерену у хімічних, біологічних та медичних дослідженнях обмежується, перш за все, високим ступенем гідрофобності молекул C_{60}, їх агломерацією у водному середовищі, утворенням наночастинок різного розміру і, як наслідок, нестабільністю водних дисперсій наночастинок C_{60} фулерену. Біологічна активність немодифікованого C_{60} фулерену значною мірою залежить від його концентрації у водному середовищі, розподілу за розміром утворених наночастинок, поверхневого заряду, що і пояснює певні протиріччя даних відносно токсичності C_{60} фулерену [4].

Розмір частинок C_{60} фулерену у водних розчинах визначали методом динамічного розсіяння світла (ДРС) на лазерному кореляційному спектрометрі ZetaSizer-3 (Malvern Instruments, Великобританія), обладнаний He-Ne лазером ЛГН-111 (потужність P=25 мВт, довжина хвилі збудження λ=633 нм). Діапазон вимірювання приладу становить від 1 нм до 20 мкм. Робота спектрометра

базується на аналізі кореляційних характеристик флуктуації інтенсивності розсіяного світла при проходженні лазерного променя через середовище. Вимірювання кореляційної функції флуктуацій інтенсивності розсіяного світла та інтегральної інтенсивності розсіювання дозволяє розрахувати коефіцієнт трансляційної дифузії дисперсних частинок у рідинах та за рівнянням Стокса-Ейнштейна визначити розподіл частинок у рідинах за ефективним гідродинамічним діаметром.

Досліджувану водну суспензію в об'ємі 1 мл поміщали у циліндричну оптичну кварцову кювету діаметром 10 мм, яку потім вставляли у лунку лазерного кореляційного спектрометра. Реєстрацію лазерного випромінювання, розсіяного від водного розчину частинок, проводили багаторазово упродовж 180 с за температури +22 °С під кутом розсіювання 90°. Отримані результати вимірювань обробляли за допомогою сервісної комп'ютерної програми PCS-Size mode v1.61. Агрегатний стан частинок C_{60} фулерену оцінювали у водному середовищі без добавок та з додаванням NaCl (0,9%).

Відносна агломерація молекул C_{60} у водній дисперсії визначається двома основними факторами - способом отримання цих наночастинок і складу біологічного/суспензійного середовища, яке часто містить диспергуючі речовини: тетрагідрофуран, диметилсульфоксид, полівінілпіролідон для забезпечення стабільності водних дисперсій [5]. Крім того, як біологічні рідини організму, так і культуральні середовища характеризується високим вмістом електролітів (солі, амінокислоти, вітаміни), які є необхідними для нормального функціонування організму та клітинного росту, але сприяють агломерації молекул C_{60}. Тому важливим було оцінити розподіл за розміром наночастинок немодифікованого C_{60} фулерену у водних середовищах, які відрізняються за сольовим складом.

Оскільки гідрофобність поверхні немодифікованого C_{60} фулерену сприяє самозбиранню і агрегації молекул C_{60} з формуванням частинок різного розміру, то спочатку було проаналізовано з часом агрегатний стан молекул C_{60} у водному розчині. Під час проведення повторюваних упродовж 15 хв трьох вимірювань гідродинамічний діаметр частинок C_{60} фулерену у водному розчині змінювався

від 10 до 120 нм із середнім значенням піку 50 нм (Рис. 1.2, криві 1-3). Інтенсивність світлового розсіювання та середній розмір наночастинок упродовж цього періоду не змінювалися, що свідчить про відсутність агломерації молекул C_{60} або їх седиментацію.

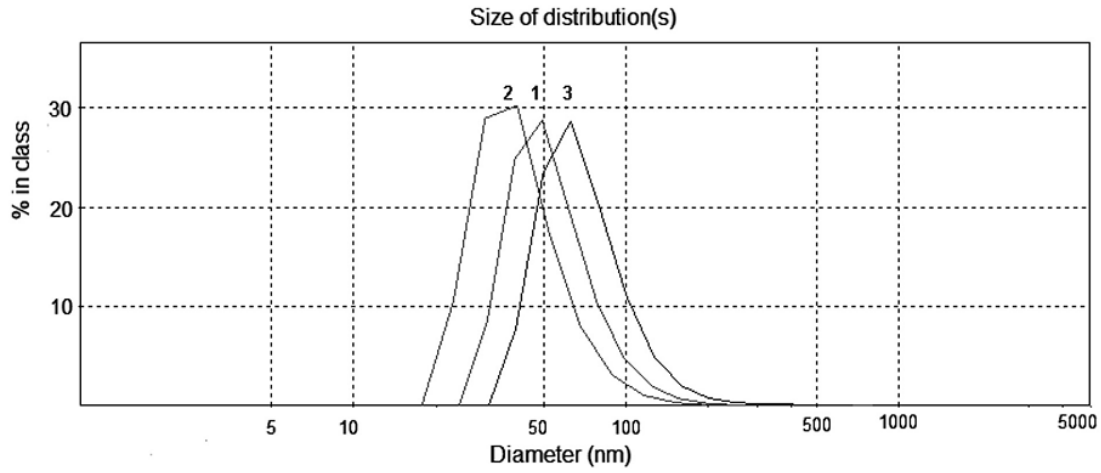


Рисунок 1.2. - Динамічне світлорозсіювання водного колоїдного розчину 100 мкМ C_{60} фулерену. Проводили три вимірювання кожні 5 хв (піки 1, 2 і 3) упродовж 15 хв.

Поведінка C_{60} фулеренових наночастинок, які мають негативний поверхневий заряд, визначається не лише гідрофобними і Ван-дер-Ваальсовими, але й електростатичними взаємодіями, тобто залежить від присутності електролітів у середовищі розчинення [6].

Порівняльний аналіз відносної кількості певного розміру C_{60} фулеренових частинок вказує на те, що у водному зразку значну частину (70%) складають наночастинки діаметром біля 50 нм, тоді як у фізіологічному розчині виявлено частинки C_{60} фулерену розміром від 40 до понад 200 нм.

Отже, агрегатний стан частинок C_{60} фулерену у розчині NaCl змінюється, а саме: спостерігається відхиленням вправо як діапазону розміру частинок, так і значення піку, що свідчить про зростання вмісту більших за діаметром частинок C_{60} фулерену (від 40 до понад 200 нм) порівняно з таким у водному розчині (від 10 до 120 нм).

Нарешті, значення дзета-потенціалу (потенціал на межі фаз між твердим тілом і рідиною) для C_{60}ВРФ складало -26,6 мВ, що свідчить про його високу стабільність і залежить від часу приготування.

1.3 Дослідження структурної самоорганізації C_{60}ВРФ залежно від концентрації (форма та розмір частинок) за використання мікроскопічного методу (АСМ)

Агрегатний стан C_{60} фулеренів у воді контролювали за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ, Solver Pro M-система, NT-MDT, Росія). Візуалізацію зразка в експериментах АСМ проводили у напівконтактному режимі з використанням зондів NSG10. Як підкладку використовували свіжосколоту атомно-гладку поверхню слюди (V1 grade, SPI Supplies), на обмежену ділянку якої наносили краплю розчину, що містить частинки. Вимірювання проводили на сухих шарах після повного випаровування розчину.

АСМ дослідження плівок C_{60} фулеренів, осаджених із C_{60}ВРФ, виявили високий ступінь дисперсії молекул у водному розчині. C_{60}ВРФ містить як поодинокі C_{60} фулерени, так і їх лабільні сферичні наноагрегати розміром 1,5-100 нм. Більшість молекул C_{60} розташовані хаотично та відокремлено вздовж поверхні (див. об'єкти висотою ~0,7 нм на рис. 1.3), або у вигляді об'ємних скупчень, що складаються з декількох десятків і навіть сотень молекул C_{60} [7] (об'єкти висотою 1,5-50 нм на рис. 1.3).

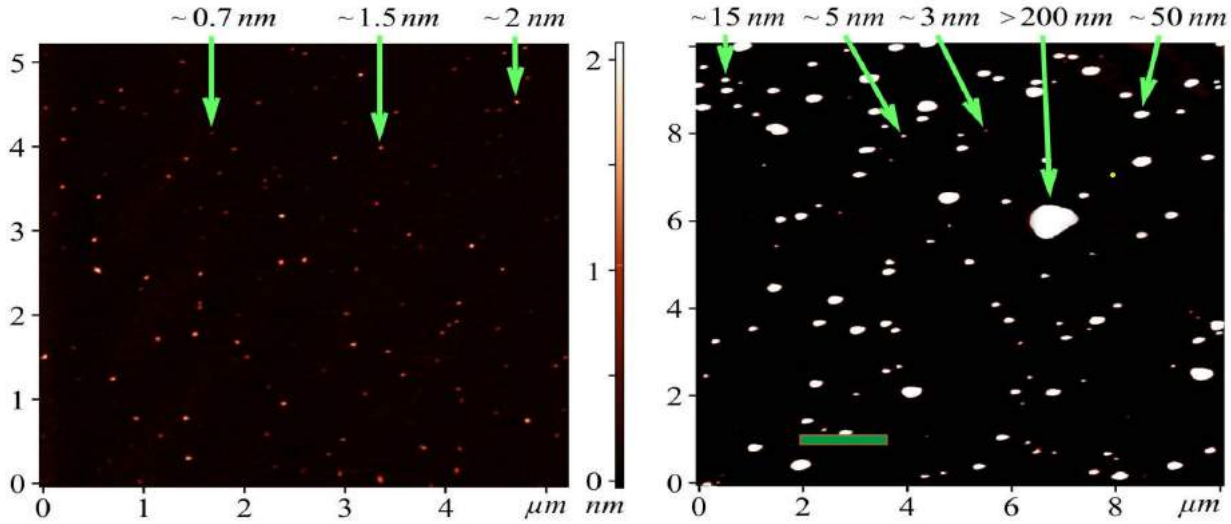


Рисунок 1.3. – АСМ зображення плівки C_{60} фулеренів, осаджених із C_{60}ВРФ на поверхню слюди (концентрація C_{60} фулеренів складає 37,5 мкг/мл). Стрілки вказують висоту окремих нанооб'єктів.

2 Дизайн комплексів «C_{60}-протеїн»

2.1 Пошук активних протеїнів-мішеней у складі досліджуваних коронавірусів, включаючи і SARS-CoV-2, та чутливих до них клітин різних органів, здатних зв’язуватися із C_{60} фулереном

Відповідно до звітів ВООЗ станом на сьогодні спостерігається інтенсивне поширення SARS-CoV-2 у всіх без виключення країнах. Так, наразі зафіксовано 55 млн. випадків зараження на Covid-19, з яких 1,33 млн. смертей. Саме тому дослідження можливих шляхів нівелювання впливу SARS-CoV-2 на організм людини є глобальним питанням сучасної біомедицини. Наявні літературні дані свідчать, що блокування/інгібування його функціональної активності може реалізовуватися, зокрема, через такі молекулярні механізми дії водорозчинних C_{60} фулеренів: (1) C_{60} фулерени безпосередньо взаємодіють з білками коронавірусу, наприклад, RdRp (RNA-dependent RNA polymerase; відіграє ключову роль у синтезі вірусної РНК) або 3CLpro (3-chymotrypsin-like protease; бере активну участь у спричинені мутацій Nsps (non-structural proteins), що є критично необхідним для життєвого циклу коронавірусу [8] і, таким чином, пригнічують його функціональну активність; (2) C_{60} фулерени блокують проникнення коронавірусу в клітину шляхом безпосередньої взаємодії з його структурними

складовими, зокрема S-глікопротеїнами «корони», або поверхневим протеїном клітин господаря, наприклад, ACE2 або TMPRSS2. Потенційна реалізація хоча б одного з таких типів блокувань запобігатиме утворенню, наприклад, S-глікопротеїн-ACE2 комплексу і, таким чином, перешкоджатиме проникненю коронавірусу в клітину [9]. Зауважимо, що оскільки водорозчинні наночастинки C_{60} фулерену здатні пароникати всередину клітини, механізми (1) і (2) можуть реалізовуватися як у позаклітинному, так і внутрішньоклітинному просторах.

Оцінивши пул структурних даних на цьому етапі, детальне дослідження провели щодо реалізації першого припущеного механізму блокування SARS-CoV-2. Структури для 3CLpro (PDB ID 6M2N) та RdRp (PDB ID 7BV2) були взяті з RCSB Protein Data Bank. Спочатку всі молекули води та природні ліганди були видалині зі структури протеїнів. Потім, перед поверхневим аналізом протеїнів-мішеней та виявленням потенційних кишень зв'язування для C_{60} фулерену, до протеїнів додали всі відсутні атоми гідрогену та провели корекцію протонування амідів та бічних ланцюгів відповідно до клітинного рівня pH. Нарешті, провели енергетичну мінімізацію отриманих структур. Потенційні кишені зв'язування визначили за допомого «cavity computational algorithm» у програмному пакеті Caver. Як результат для RdRp (рис. 2.1) та 3CLpro (рис. 2.2) протеїнів виявили три та один сайт зв'язування, відповідно. У випадку з RdRp намагалися заблокувати канал синтезу РНК (рис. 2.1, сайт зв'язування 1) та сайти зв'язування з Nsp7 або Nsp8 ко-факторами (рис. 2.1, сайт зв'язування 1 та 2), утворення комплексу з якими є критичним для функціонування RdRp [8]. Найбільш обіцяючий сайт зв'язування для 3CLpro детектували у проміжку між двома доменами (це власне і є нативний сайт зв'язування) [10, 11] - тут знаходиться каталітична діада (Cys145 та His41), блокування якої негативно впливає на функціональну активність 3CLpro (рис. 2.2).

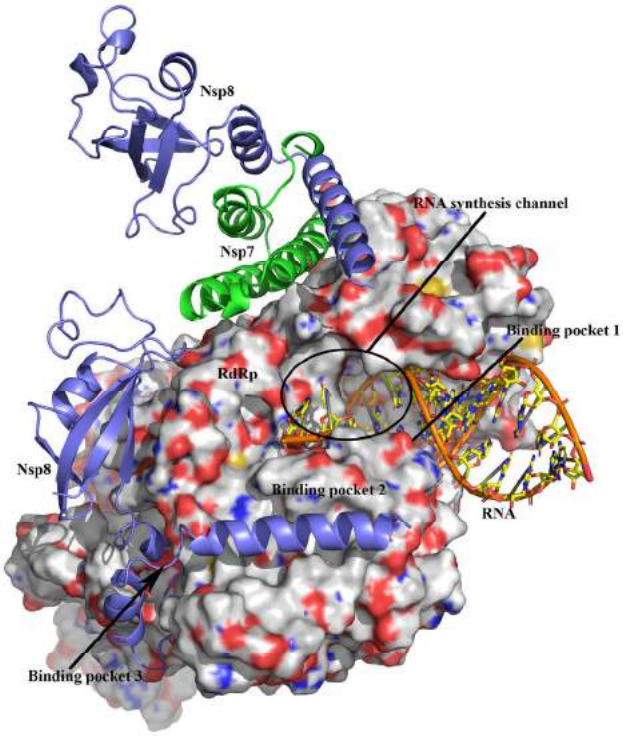


Рисунок 2.1. - Поверхнева діаграма SARS-CoV 2 RdRp у комплексі з Nsp7 (зеленим кольором) та Nsp8 (фіолетовим) ко-факторами і молекулою РНК (помаранчевий та жовтий кольори). Nsp8 зв'язується з RdRp двома варіантами: безпосереднє зв'язування (саме тут розміщені два досліджувані сайти зв'язування) та у комплексі з Nsp7 (нажаль, у цьому випадку сайт є доволі плоским і тому місця для взаємодії із C_{60} фулереном не має).

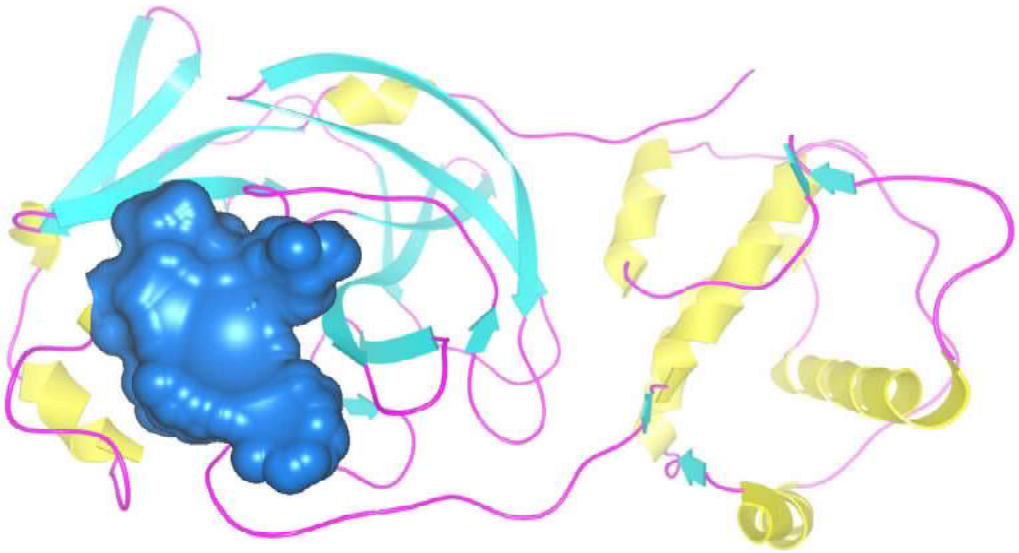


Рисунок 2.2. - Зображення вторинних структур 3CLpro то потенційного сайту зв'язування для C_{60} фулерену (синій колір).

2.2 Дизайн оптимально можливих комплексів «C_{60}-протеїн» в імітованому клітинному середовищі за використання методу молекулярної динаміки та докінгу

Для молекулярного докінгу використали жорстку молекулу протеїну та гнучку, наскільки це можливо, молекулу C_{60}. Застосували вбудований у QXP алгоритм систематичного докінгу (sdock+) [12]. Максимальна кількість кроків розрахунку складала 300, найкращий «C_{60}-3CLpro» комплекс, виходячи з внутрішніх скоринг-функцій QXP [13] (контактна поверхня та відстань між ключовими амінокислотами 3CLpro і C_{60} фулереном), відібрали для подальших досліджень.

Результат молекулярного докінгу свідчить про здатність C_{60} фулерену інгібувати каталітичну діаду 3CLpro. C_{60} фулерен щільно заповнює сайт зв'язування біля каталітичної діади та блокує її взаємодію з будь-якими іншими молекулярними структурами. У цьому комплексі найбільш вираженими є стекінг взаємодія C_{60} фулерену з His 41, Cys 145, Met 49, Met 165 та стерична взаємодія з Met 49, Gln 189, Asn 142 (Рис. 2.3).

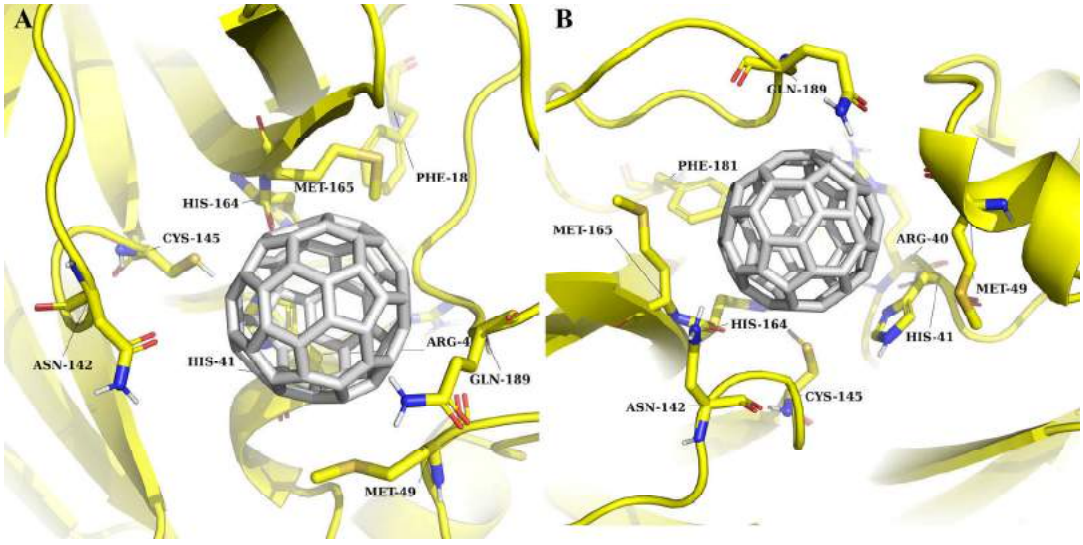


Рисунок 2.3. – Каталітичний сайт зв'язування 3CLpro (жовтий колір) у комплексі із C_{60} фулереном (сірий колір): А – результат молекулярного докінгу, В – результат МД.

Оцінку стабільності/конформаційних змін отриманих комплексів провели з використанням методу молекулярної динаміки (МД). Усі розрахунки виконали у програмному пакеті Gromacs 2020 [14] та силовому полі Charmm36 [15]. Досліджуваний комплекс протонувався відповідно до імплементованої у Gromacs 2020 функції “ingh”. Топологію для C_{60} фулерену побудували, використовуючи онлайн сервер SwissParam [16]. Після цього систему помістили у квадратний бокс та заповнили його молекулами води (TIP3P). Мінімальна відстань між стінками боксу та найближчим атомом комплексу складала 9 Å, завдяки чому комплекс може вільно обертатися та взаємодіяти у цьому середовищі. Для нейтралізації системи туди додали іони Na^+/Cl^- (для імітації клітинного середовища їх концентрація у боксі складала 0,15 М). Потім провели мінімізацію енергії, а далі - два етапи еквілібрації: (1) NVT (constant Number of particles, Volume, and Temperature) і (2) NPT (constant Number of particles, Pressure, and Temperature). Нарешті, основний етап МД симуляції тривав 50 нс.

За результатами МД отриманий комплекс є стабільним упродовж усієї траєкторії динаміки. Так, Rmsd (Root mean square deviation) комплексу знаходиться в межах 2-3 Å. Більше того, завдяки такій рухливості C_{60} фелерен здатний взаємодіяти з новим пулом амінокислот, які можуть бути більш вигідними для стабільності комплексу.

Загалом, під час МД симуляції зафіксували наступні ключові зміни у досліджуваному комплексі: у каталітичному сайті C_{60} фулерен зміщується на 3,2 Å та тягне за собою Asn 142 (його зміщення становить 4.8 Å). Внаслідок такого зміщення Gln 189 витискається зі свого нативного положення C_{60} фулереном на відстань 1.8 Å та утворює π-катіон взаємодію з Arg 40. Щодо взаємодії з каталітичною діадою та Phe 181, C_{60} фулерен утворює з ними стекінг взаємодію, як і після молекулярного докінгу. Але що цікаво, C_{60} фулерен змінює нативну орієнтацію His 41 та Cys 145 (каталітична діада). Як наслідок, цілісність каталітичної діади порушується, що, без сумніву, негативно впливає на функціонування 3CLpro.

Отже, відповідно до результатів молекулярного докінгу та МД доведено, що C_{60} фулерен здатний утворювати стабільні комплекси з 3CLpro протеїном SARS-CoV-2, а відтак - пригнічувати його функціональну активність.

Висновки

Приготовлено та охарактеризовано водний колоїдний розчин C_{60} фулеренів (C_{60}ВРФ) максимальної концентрації 0,15 мг/мл за використання оригінальної ультразвукової технології, атомно-силової мікроскопії (АСМ) та спектроскопічного методу ДРС (динамічне розсіяння світла). Показано, що C_{60}ВРФ містить як поодинокі молекули C_{60}, так і їх лабільні сферичні наноагрегати розміром 1,5-100 нм. Значення дзета-потенціалу для C_{60}ВРФ складало -26,6 мВ, що свідчить про його високу стабільність. Здійснено літературний пошук та відібрано активні протеїни-мішені у складі досліджуваних коронавірусів, у тому числі і SARS-CoV-2, (RdRp – РНК-залежна РНК полімераза та 3CLpro – 3-хімотрипсин-подібна протеаза) та чутливих до них клітин різних органів (ACE2 – ангіотензин-перетворюючий фермент 2 та TMPRSS2 – трансмембранна серинова протеаза типу II), здатних зв’язуватися із C_{60} фулереном. Так, для RdRp та 3CLpro протеїнів ідентифікувано чотири сайти зв’язування: три (1. кишеня розміщена у каналі синтезу РНК; 2/3. різні частини інтерфейсу зв’язуванн RdRp-Nsp8) та одна (кишеня розміщена біля каталітичної діади (Cys145 та His41) на стику структурних доменів 3CLpro), відповідно. Здійснено дизайн потенційних комплексів «C_{60}-протеїн», зокрема «C_{60}-3CLpro», в імітованому клітинному середовищі за використання методів молекулярної динаміки та докінгу. Показано, що C_{60} фулерен може утворювати стабільний комплекс з білком 3CLpro коронавірусу SARS-CoV-2 і, таким чином, пригнічувати його функціональну активність.

Перелік джерел посилання

1. Ritter U., Prylutskyy Y.I., Evstigneev M.P., Davidenko N.A., Cherepanov V.V., Senenko A. I., Marchenko O.A., Naumovets A. G. Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct., 2015, V. 23, P. 530–534.
2. Prylutskyy Yu.I., Petrenko. V.I., Ivankov O.I., Kyzyma O.A., Bulavin L.A., Litsis O.O., Evstigneev M.P., Cherepanov V.V., Naumovets A.G., Ritter U. On the origin of C_{60} fullerene solubility in aqueous solution. Langmuir, 2014, V. 30, N 14, P. 3967-3970.
3. Scharff P., Risch K., Carta-Abelmann L., Dmytruk I.M., Bilyi M.M., Golub O.A., Khavryuchenko A.V., Buzaneva E.V., Aksenov V.L., Avdeev M.V., Prylutskyy Yu.I., Durov S.S. Structure of C_{60} fullerene in water: spectroscopic data. Carbon, 2004, V. 42, P. 1203–1206.
4. Horie M., Nishio K., Kato H., Shinohara N., Nakamura A., Fujita K., Kinugasa S., Endoh S., Yamamoto K., Yamamoto O., Niki E., Yoshida Y., Iwahashi H. *In vitro* evaluation of cellular responses induced by stable fullerene C_{60} medium dispersion. J. Biochem., 2010, V. 148, P. 289–298.
5. Buford M.C., Hamilton Jr.R.F., Holian A. A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. Part. Fibre Toxicol., 2007, V. 4, Article number 6.
6. Chen K.L., Elimelech M. Aggregation and Deposition Kinetics of Fullerene (C_{60}) Nanoparticles. Langmuir, 2006, V. 22, P. 10994-11001.
7. Prilutski Yu., Durov S., Bulavin L. Study of structure of colloidal particles of fullerenes in water solution. Mol. Cryst. Liq. Cryst., 1998, V. 324, P. 65-70.
8. Wua C., Liu Y., Yang Y. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. Acta Pharmaceut. Sinica B, 2020, V. 10, P. 766-788.
9. Wang Q., Zhang Y., Wu L. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. Cell, 2020, V. 181, P. 894-904.
10. Kirchdoerfer R.N., Ward A.B. Structure of the SARS-CoV NSP12 polymerase bound to NSP7 and NSP8 co-factors. Nature Commun., 2019, V. 10: 2342.
11. Qamar M.T., Alqahtani S.M., Alamri M.A. Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. J. Pharmaceut. Anal., 2020, V. 10, P. 313-319.
12. Warren G.L., Andrews C.W., Capelli A.M. A critical as-sessment of docking programs and scoring functions. J. Med. Chem., 2006, V. 49, P. 5912-5931.
13. McMartin C., Bohacek R.S. QXP: powerful, rapid computer algo-rithms for structure-based drug design. J. Comput. Aided Mol. Des., 1997, V. 11, P. 333-344.
14. http://www.gromacs.org/
15. Huang J., MacKerell A.J. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. J. Comput. Chem., 2013, V. 34, P. 2135-2145.
16. Zoete V., Cuendet M.A., Grosdidier A. SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. J. Comput. Chem., 2011, V. 32, P. 2359-2368.

Етап 1 (2021 р.): Оцінка стабільності одержаних комплексів «C_{60}-протеїн» в імітованому клітинному середовищі методами молекулярної динаміки, їх вільної енергії та внеску кожної амінокислоти у зв'язування між C_{60} фулереном і протеїном. Дослідження структурної самоорганізації і стабільності C_{60}ВРФ залежно від концентрації (розподіл частинок за розміром, індекс полідисперсності та значення дзета-потенціалу) за використання спектроскопічного (ДРС) методу. Дизайн оптимального нанокластера C_{60} фулерену, базуючись на мікроскопічних та спектроскопічних даних характеризування C_{60}ВРФ, та оптимально можливих комплексів між нанокластером C_{60} фулерену і протеїнами-мішенями в імітованому клітинному середовищі за використання методу молекулярної динаміки. Приготування C_{60}ВРФ заданої концентрації за використання оригінальної ультразвукової технології та його первинне характеризування спектроскопічними методами (УФ-Вид і КРС). Дослідження структурної самоорганізації і стабільності C_{60}ВРФ залежно від концентрації (форма та розподіл частинок за розміром, значення дзета-потенціалу) за використання мікроскопічних (СЕМ, АСМ і СТМ) та спектроскопічного (ДРС) методів

1. Приготування і характеризування водорозчинних C_{60} фулеренів

1.1 Приготування водного колоїдного розчину C_{60} фулерену (C_{60}ВРФ) заданої концентрації та його первинне характеризування спектроскопічними методами

З метою одержання наночастинок C_{60} фулеренів спалювали графітові стержні у дузі постійного струму в атмосфері гелію за температури 6000 ^{0}C. Очищення C_{60} фулеренів здійснювали за допомогою методу гель-хроматографії з використанням як елюєнта органічного розчинника толуолу та високоефективної рідинної хроматографії (Jasco PU-2086, ФРН). Далі толуол видаляли шляхом випаровування у вакуумі. Після цього до суміші очищених C_{60} фулеренів (чистота складала понад 99,5%) додавали дистильовану воду. Для одержання водного розчину C_{60} фулерену (C_{60}ВРФ) з рівномірним розподілом молекул C_{60} його обробляли ультразвуком (частота 8 Гц, тривалість 8 год) [1]. Отриманий темно-коричневий водний розчин C_{60} фулерену (максимальна концентрація 0,6 мг/мл) є типовою молекулярно-колоїдною системою, яка стабільна упродовж 12-18 місяців за температури +4 ^{0}C. До складу цього розчину стабілізатори не входять.

Використання спектроскопічних методів, зокрема УФ-Вид і КРС (комбінаційне розсіяння світла), підтвердило присутність молекул C_{60} у воді за характерними частотами [2].

Синтез C_{60} фулеренів, їх очищення і приготування C_{60}ВРФ заданої концентрації за використання оригінальної ультразвукової технології та його первинне характеризування спектроскопічними методами (УФ-Вид і КРС) були проведені спільно з німецькими вченими у хімічній лабораторії Інституту хімії та біотехнології Технічного університету Ільменау (Ільменау, ФРН) під час наукового візиту.

1.2 Дослідження структурної самоорганізації C_{60}ВРФ залежно від концентрації (розподіл частинок за розміром, індекс полідисперсності та значення дзета-потенціалу) за використання спектроскопічного методу (ДРС)

Розподіл частинок C_{60} фулерену за розміром у водних розчинах, індекс полідисперсності (PDI) та значення дзета-потенціалу визначали методом динамічного розсіяння світла (ДРС) на лазерному кореляційному спектрометрі ZetaSizer-3 (Malvern Instruments, Великобританія), обладнаний He-Ne лазером ЛГН-111 (потужність P=25 мВт, довжина хвилі збудження λ=633 нм). Діапазон вимірювання приладу становить від 1 нм до 20 мкм. Робота спектрометра базується на аналізі кореляційних характеристик флуктуації інтенсивності розсіяного світла при проходженні лазерного променя через середовище.

Досліджувану водну суспензію в об’ємі 1 мл поміщали у циліндричну оптичну кварцову кювету діаметром 10 мм, яку потім вставляли у лунку лазерного кореляційного спектрометра. Реєстрацію лазерного випромінювання, розсіяного від водного розчину частинок, проводили багаторазово упродовж 180 с за температури +22 °С під кутом розсіювання 90°. Отримані результати вимірювань обробляли за допомогою сервісної комп’ютерної програми PCS-Size mode v1.61.

Агрегатний стан частинок C_{60} фулерену (концентрація 0,15 мг/мл) оцінювали у водному середовищі без добавок та з додаванням сироватки альбуміну (5%).

Відомо, що біологічні рідини організму, так і культуральні середовища характеризується високим вмістом електролітів (солі, амінокислоти, вітаміни), які є необхідними для нормального функціонування організму та клітинного росту, але сприяють агломерації молекул C_{60}. Тому важливим було оцінити розподіл за розміром частинок C_{60} фулерену у водних середовищах, які відрізняються за сольовим та протеїновим складом.

Отримані результати ДРС показали, що свіжоприготовлений C_{60}ВРФ є високополідисперсним розчином (значення PDI склало 0,44), у якому переважно містяться агрегати з гідродинамічним діаметром від 15 до 115 нм, при цьому значна частина (35%) припадає на наночастинки діаметром 47 нм (Рис. 1.1, крива 1). Значення дзета-потенціалу для C_{60}ВРФ складало -24,5 мВ, що свідчить про його високу стабільність.

Оскільки обов'язковим компонентом культуральних поживних середовищ, наближених за складом до біологічних рідин, є білки, тому був досліджений розподіл за розміром частинок C_{60} фулерену при внесені їх у середовище альбуміну.

Характерний діапазон розміру наночастинок у 5%-му водному розчині альбуміну становив 2-26 нм з піком порядку 5 нм (Рис. 1.1, крива 2). При змішуванні C_{60}ВРФ та альбуміну діаметр утворених наночастинок у такому розчині збільшувався від 4 до 40 нм з піком порядку 10 нм (Рис. 1.1, крива 3), що свідчить про зв'язування C_{60} фулерену з альбуміном.

Таке зв'язування попереджало агломерацію поодиноких молекул C_{60}, викликану NaCl, оскільки в розчині, який містив альбумін, NaCl і C_{60} фулерен, розмір наночастинок (Рис. 1.1, крива 4) залишався майже у тому ж діапазоні (4,5-45 нм), як і в C_{60}ВРФ з альбуміном, а значення середнього діаметра наночастинок у середовищі, що містило альбумін, NaCl і C_{60} фулерен (13 нм) є значно меншим, ніж наночастинок C_{60} фулерену у воді (47 нм) (Рис. 1, крива 1).

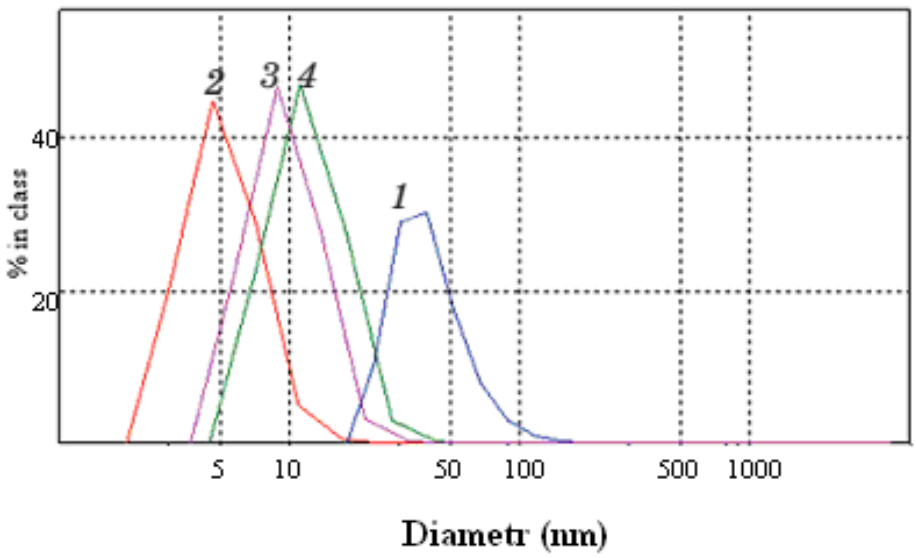


Рисунок 1.1. - Динамічне світлорозсіювання C_{60}ВРФ (1), альбуміну (2), C_{60} фулерену і альбуміну (3), C_{60} фулерену, альбуміну і 0,9% NaCl (4).

Отже, наявність альбуміну в середовищі попереджає спонтанну та індуковану NaCl агломерацію наночастинок C_{60} фулерену.

1.3 Дослідження структурної самоорганізації C_{60}ВРФ залежно від концентрації (форма та розмір частинок) за використання мікроскопічних методів (СЕМ, АСМ і СТМ)

Структурний стан C_{60} фулерену дослідили сучасними методами атомно-силової (АСМ), сканувальної електронної (СЕМ) і сканувальної тунельної (СТМ) мікроскопії, які забезпечують візуалізацію нанорозмірних об’єктів, зокрема мономолекулярних шарів і окремих молекул на поверхні твердої підкладки. Для цього осаджували C_{60} фулерен на атомно-гладеньку поверхню підкладки з краплі розчину, а вимірювання проводили на сухих шарах після повного випаровування води.

Для досліджень методом АСМ як підкладку використовували свіжосколоту поверхню слюди (мусковіт, grade V1), яка забезпечує атомну гладкість і відсутність дефектів типу "сходинка" на ділянках протяжністю в сотні мікронів. Вимірювання проводили на системі «Solver Pro M» (NT-MDT, Росія) у

напівконтактному режимі. Експерименти з різними типами зондів показали, що оптимальними для досліджень шарів C_{60} фулерену є зонди "RTESPA-150" і "RFESP-75" (Bruker, США), робоче притискування яких до поверхні за її сканування не призводив до зсуву молекул. Значну увагу також приділяли підбору поверхневої концентрації осадженого шару молекул C_{60}. Методично оптимальною вважали таку концентрацію, за якої на ділянці поверхні в межах растру сканування знаходилося кілька десятків окремих об'єктів, що дозволяло правильно визначити їх висоту. Це досягалося насамперед зниженням концентрації C_{60}ВРФ безпосередньо перед його нанесенням, а також вибором місця сканування.

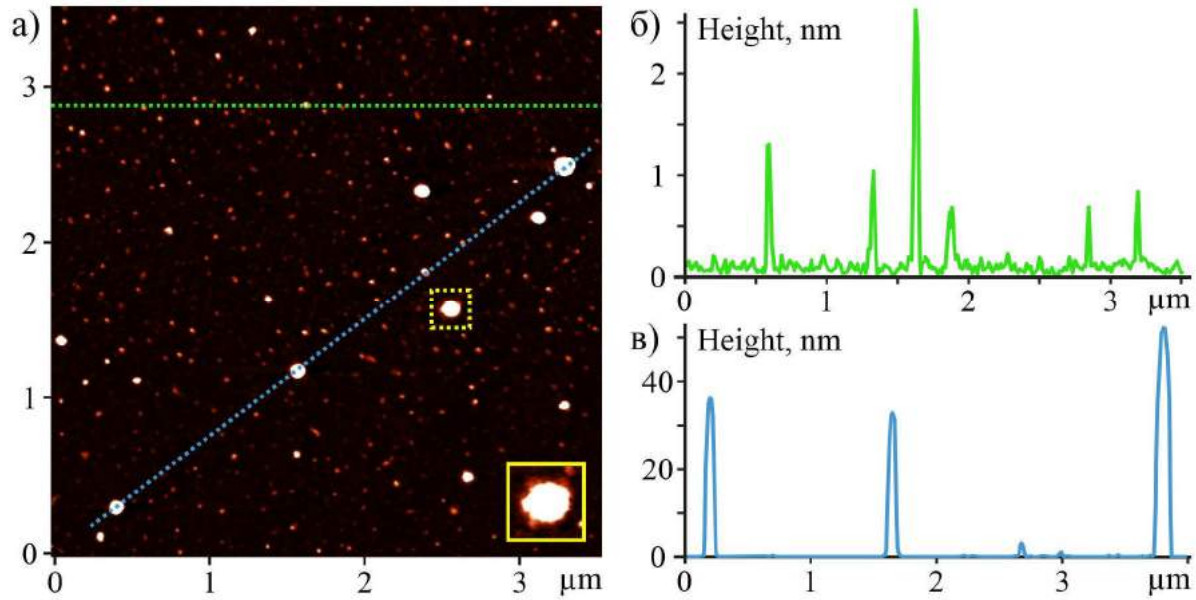


Рисунок 1.2. - АСМ-зображення шару C_{60} фулерену, осадженого з необробленого C_{60}ВРФ на поверхню слюди (а), та його *Z*-перетини вздовж ліній, позначених на зображенні (б, в). На вставці (а) – виділений фрагмент зображення.

Були отримані чіткі АСМ-зображення C_{60} фулерену (Рис. 1.2а), що свідчить про високу хімічну чистоту як самого матеріалу і розчинника, так і умов вимірювань. На зображеннях видно хаотично розміщені об'єкти, які за формою і розмірами можна умовно розділити на дві групи. До першої з них відносяться точкові об’єкти висотою до 10 нм, серед яких максимальна кількість була з

висотами у межах 0,7–3 нм (Рис. 1.2б). Висота найменших з них (0,7 ± 0,2 нм) добре узгоджується з молекулярним діаметром C_{60}, що дозволило ідентифікувати їх як окремі молекули. Більші об'єкти відповідають об’ємним кластерами C_{60} фулерену. Вони мали симетричні колоколоподібні профілі з різкими максимумами посередині. Це є ознакою того, що об’єднання частини молекул у кластери відбулося у C_{60}ВРФ ще до їх нанесення на підкладку.

До другої групи віднесені об’єкти висотою 10 – 100 нм неправильної форми (Рис. 1.2в). Для них характерні нечіткі контури або присутність протуберанців товщиною в один моношар на краях (див. вставку на Рис. 1.2а). Це характерно при самозбиранні молекул на поверхні підкладки під час осадження з розчину з утворенням об’ємних агрегатів згідно механізму острівцевого росту Вольмера–Вебера. Для зменшення ймовірності цього процесу концентрація молекул C_{60} у C_{60}ВРФ була додатково зменшена у 25–100 разів і проведена ультразвукова обробка розчину перед його нанесенням на поверхню. Після цього на АСМ-зображеннях спостерігали тільки об’єкти з першої групи, тобто окремі молекули або кластери висотою до 10 нм (Рис. 1.3).

Для вивчення впливу початкової концентрації C_{60}ВРФ на ступінь кластеризації C_{60} фулерену ми проаналізували статистику розподілу об’єктів за висотою для розчинів різних концентрацій – 0,6 мг/мл (Рис. 1.3а) і 0,15 мг/мл (Рис. 1.3б). У вибірці використані АСМ дані про 100 випадково відібраних молекул або кластерів у межах певної ділянки поверхні. Для кожного об’єкту був побудований Z-перетин через його центр, що дозволило визначити висоту. На її основі об’єкт попадав в одну з розмірних груп: 0,7±0,2 нм; 1,3±0,2 нм; 2,0±0,2 нм; 2,8±0,2 нм; 3,5±0,2 нм, яка відповідає від одного до п’яти діаметрів молекули C_{60}. Для “високої” (0,6 мг/мл) концентрації відносна кількість поодиноких молекул складала 60% (0,7 нм); кластерів: 28% (1,3 нм), 4% (2,0 нм), 4% (2,8 нм), 4% (3,5 нм). Для “низької” (0,15 мг/мл) концентрації розподіл виглядав так: 68% (0,7 нм), 16% (1,3 нм), 16% (2,0 нм), 0% (2,8 нм), 0% (3,5 нм). Як видно, для обох концентрацій кількісно переважають C_{60} фулерени у неагрегованому стані. Але

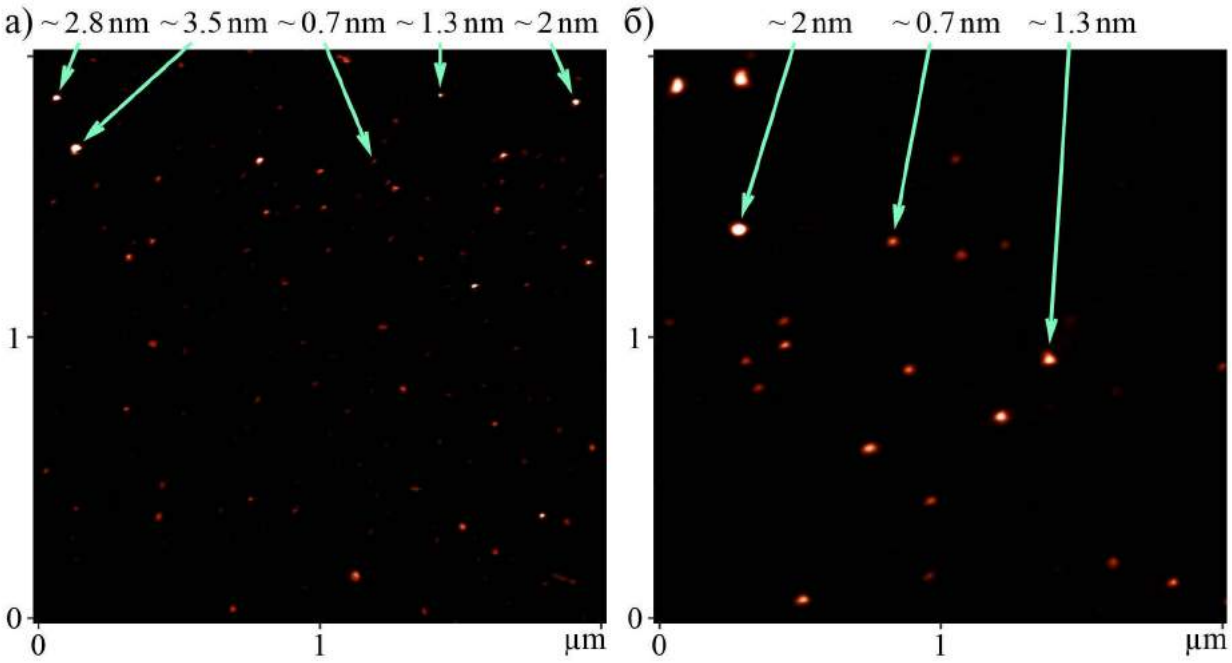


Рисунок 1.3. - АСМ-зображення шарів C_{60} фулерену, осаджених на поверхню слюди з C_{60}ВРФ концентрацією 0,6 мг/мл (а) і 0,15 мг/мл (б). Числа при стрілочках вказують висоту об'єктів.

враховуючи той факт, що кількість молекул у кластері збільшується у кубічній залежності від його діаметру, основна кількість молекул C_{60} містилася у кластерах діаметрами ~ 2,8 і ~ 3,5 нм за високої концентрації і кластерах діаметром ~ 2,0 нм за низької концентрації.

Внаслідок впливу форми вістря зонду латеральні розміри об’єктів на АСМ-зображеннях виглядають збільшеними. Так, на приведених рисунках ширина профілів кластерів або окремих молекул на половині висоти складала ≥10 нм. Тому, при використанні тільки одного методу АСМ важко визначити, що саме ми бачимо – окрему молекулу, чи моношаровий острівець діаметром у кілька нанометрів. Тому ми вивчили агрегатний стан C_{60} фулерену комплементарними методами СЕМ і СТМ, які у порівнянні з АСМ дають більш реалістичну інформацію про латеральні розміри об’єктів. Ці дослідження були проведені на електропровідних підкладках виробництва Phasis (Швейцарія), що містять плівку золота, напилену на слюдяну основу. Для отримання атомно-гладенької реконструйованої поверхні Au(111) підкладки відпалювалися у полум’ї газового пальника безпосередньо перед вимірюванням.

СЕМ-зображення шарів C_{60} фулерену були отримані на приладі JSM-35 (Японія) у режимі повільних вторинних електронів. Особливість цього режиму полягає у тому, що глибина виходу електронів складає лише 2–3 нм і, головним чином, вони несуть інформацію про стан поверхневої ділянки об'єкту. Для зменшення ділянки проникнення первинних електронів та підвищення контрасту топографічних деталей підкладка нахилялась до електронного пучка під кутом 60°. Для виявлення деталей, специфічних для C_{60} фулерену, та відокремлення їх від структури самої підкладки ми отримали зображення ділянки поверхні, що була лише частково вкрита шаром C_{60} фулерену (Рис. 1.4). На ділянці чистої підкладки (G) спостерігаються окремі ділянки мікронних розмірів з різною яскравістю зображення, які відповідають кристалічним ділянкам золота з різним кутом нахилу до зонду. Аналогічні за розміром та контрастом ділянки спостерігали і на ділянці F, вкритій C_{60} фулеренами. Але їх яскравість на ділянці F дещо нижча, ніж на чистій підкладці золота. Це пов'язано з наступним. Інтенсивність сигналу повільних вторинних електронів залежить від середнього атомного номера об'єкту. На ділянці G інтенсивність сигналу визначається самим золотом, тоді як на ділянці F впливає і покриття C_{60} фулеренами. Середній атомний номер такого покриття суттєво менший за золото і це зменшує інтенсивність сигналу вторинних електронів. Але товщина покриття маленька і тому зменшення сигналу невелике. Сигнал з окремих мікронних ділянок на ділянці F достатньо однорідний в їх межах, як і на ділянці G. Це вказує на те, що C_{60} фулерени сформували достатньо однорідне покриття без формування скупчень.

СТМ-вимірювання проводили на системі «Solver Pro» (NT-MDT, Росія) у режимі постійного струму при параметрах I_t = 40–55 пА, U_t = 0,7–1,0 В. На СТМ-зображеннях переважна частина об'єктів мала висоту 0,75±0,15 нм або 1,3±0,2 нм (Рис. 1.5), що відповідає одному або двом діаметрам молекули C_{60}. Частка перших складала ~80%, а ширина їхніх профілів становила 1,5–1,8 нм. Відомо, що у

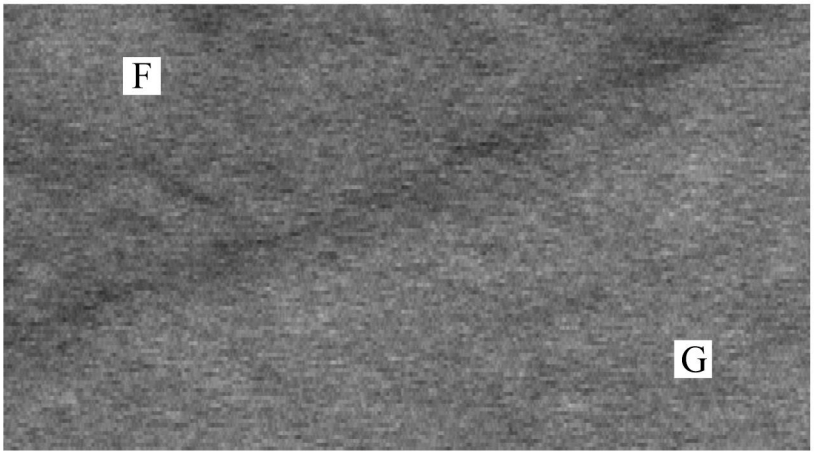


Рисунок 1.4. - СЕМ-зображення 16×9 мкм^2 чистої підкладки Au(111) (ділянка G) та підкладки, вкритої шаром C_{60} фулерену (ділянка F).

методах сканувальної зондової мікроскопії видимі латеральні розміри об'єкту є більшими від їх реальних розмірів на величину, рівну подвійному радіусу скруглення зонду. Для СТМ мінімально можливий радіус скруглення – це ширина тунельного проміжку (~0,2 нм) плюс радіус крайнього атома вістря зонду, який виготовлений зі сплаву платини та іридію, чиї атомні радіуси становлять ~0,18 нм. Таким чином, молекула C_{60}, яку можна представити у вигляді сфери діаметром ~0,7 нм, на СТМ зображеннях матиме латеральний розмір щонайменше 0,7 + 2×(0,2+0,18) = ~1,5 нм. Це доводить, що видимі на зображеннях об'єкти висотою 0,75±0,15 нм відповідають окремим молекулам C_{60} фулерену. Об'єкти більшої висоти відповідають кластерам молекул. Аналіз профілів показав, що їхня форма наближена до сферичної. Існування таких агрегатів у водних розчинах передбачене теоретично (див. нижче) і підтверджено експериментально іншими методами досліджень [1].

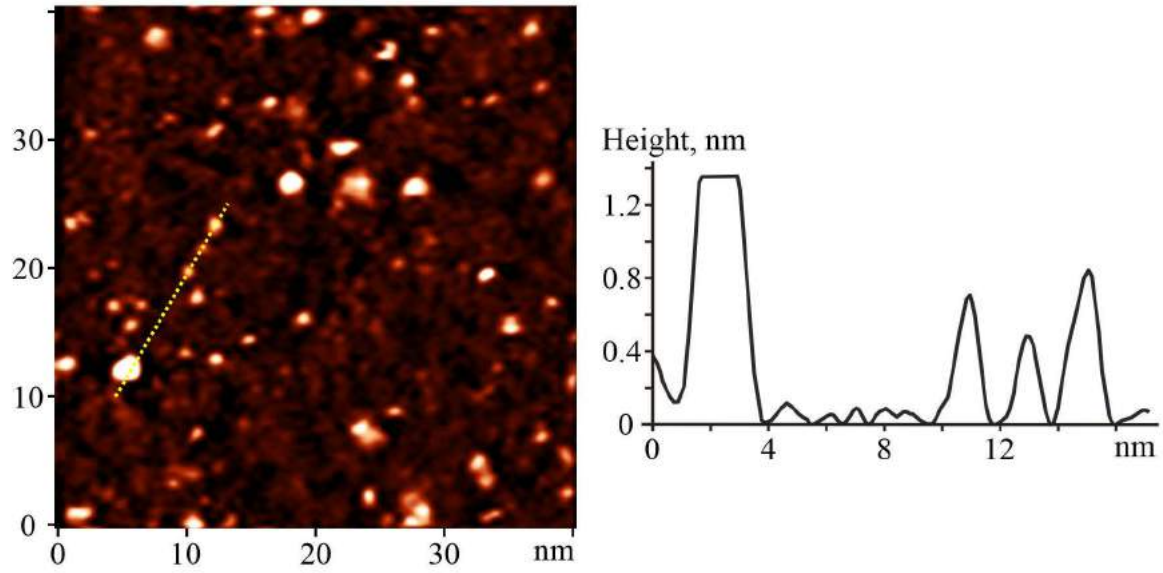


Рисунок 1.5. - СТМ-зображення шару C_{60} фулерену, осадженого із C_{60}ВРФ на поверхню Au(111), та його *Z*-перетин вздовж лінії, позначеної на зображенні.

2 Оцінка стабільності одержаних комплексів «C_{60}-протеїн» в імітованому клітинному середовищі методами молекулярної динаміки і докінгу

Як зазначалося раніше, на поверхні протеїну RdRp (за допомого «cavity computational algorithm» у програмному пакеті Caver) виявили три потенційні сайти зв'язування із C_{60} фулереном: канал синтезу РНК (1) та сайти зв'язування з Nsp7 (2) або Nsp8 (3) ко-факторами, утворення комплексу з якими є критичним для функціонування RdRp [3]. Далі для молекулярного докінгу використали жорстку молекулу RdRp та гнучку, наскільки це можливо, молекулу C_{60}. Застосували вбудований у QXP алгоритм систематичного докінгу (sdock+) [4]. Максимальна кількість кроків розрахунку складала 300, найкращий «C_{60}-RdRp» комплекс, виходячи з внутрішніх скоринг-функцій QXP [5] (контактна поверхня та відстань між ключовими амінокислотами 3CLpro і C_{60} фулереном), відбиралася для подальшого *in silico* тестування.

Відповідно до результатів молекулярного докінгу, C_{60} фулерен повністю заповнює відібрані сайти зв'язування і, більш того, є затиснутим там різноманітними стекінг та стеричними взаємодіями (Рис. 2.1A, C, E). Так,

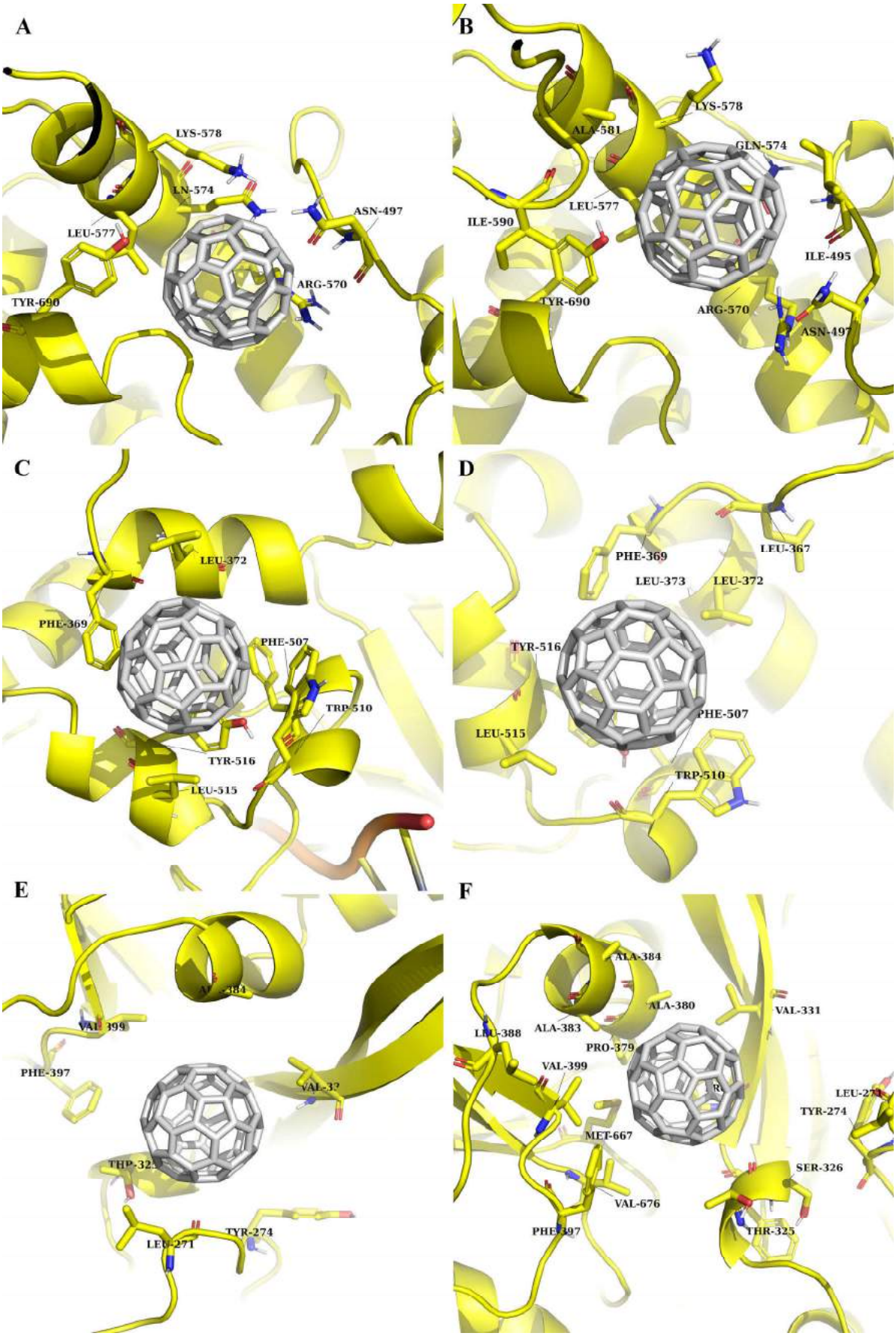
інгібування у сайті зв'язування 1 блокує канал синтезу РНК (Рис. 2.1A). У цьому випадку C_{60} фулерен ідеально заповнює кишеню зв'язування та утворює наступні взаємодії: π-стекінг з Arg 570 і Lys 578, T-стекінг з Tyr 690 та стеричні взаємодії з Asn 497 і Leu 577. На противагу вище зазначеному, зв'язування C_{60} фулерену у сайтах 2 і 3 відображає модель, де блокується утворення «RdRp-Nsp8» комплексу (Рис. 2.1C, E), що безпосередньо впливає на функціонування протеїну RdRp. У сайті зв'язування 2 нижня частина C_{60} фулерену затиснута поміж Trp 510, Phe 369 і Leu 372, Leu 515 стекінг взаємодіями. Більш того, у нижній частині цього сайту зв'язування знаходяться Tyr 516 і Phe 507, які завдяки стекінгу можуть утримувати C_{60} фулерен (Рис. 2.1C). Водночас, не зважаючи на це, відповідно до результатів молекулярного докінгу стабільність такого комплексу залишається під питанням, оскільки глибина сайту зв'язування 2 є незначною і C_{60} фулерен може бути просто виштовхнутий з нього. Кардинально інша ситуація має місце у сайті зв'язування 3. Тут практично немає жодної амінокислоти, здатної утворювати стекінг взаємодії із C_{60} фулереном. Однак, на нашу думку, ця кишеня є перспективною, оскільки глибока порівняно з іншими двома. За результатами докінгу C_{60} фулерен утворює стеричні взаємодії з Ala 384, Val 331, Val 399, Thr 325 і Leu 271. Також стерично наближеними до C_{60} фулерену є Phe 397 і Tyr 274, тобто існує ймовірність утворення з ними стекінг взаємодій (Рис. 2.1E).

Оцінку стабільності/конформаційних змін отриманих комплексів провели з використанням методу молекулярної динаміки (МД). Усі розрахунки виконали у програмному пакеті Gromacs 2020 [6] та силовому полі Charmm36 [7]. Досліджуваний комплекс протонувався відповідно до імплементованої у Gromacs 2020 функції "ingh". Топологію для C_{60} фулерену побудували, використовуючи онлайн сервер SwissParam [8]. Після цього систему помістили у квадратний бокс та заповнили його молекулами води (TIP3P). Мінімальна відстань між стінками боксу та найближчим атомом комплексу складала 9 Å, завдяки чому комплекс може вільно обертатися та взаємодіяти у цьому середовищі. Для нейтралізації системи туди додали іони Na^+/Cl^- (для імітації клітинного середовища; їх концентрація у боксі складала 0,15 М). Потім провели мінімізацію енергії, а далі -

два етапи еквілібрації: (1) NVT (constant Number of particles, Volume, and Temperature) і (2) NPT (constant Number of particles, Pressure, and Temperature). Нарешті, основний етап МД симуляції тривав 50 нс.

Відповідно до результатів МД при зв'язуванні C_{60} фулерену у сайтах 1 та 2 не спостерігається значних геометричних змін (Рис. 2.1B, D). На противагу цьому для сайту 3 спостерігається кардинально інша картина (Рис. 2.1F). Тут C_{60} фелерен занурився у сайт зв'язування на 4 Å. Хоча, відмітимо, що загалом для усіх сайтів зв'язування за результатами МД ключові взаємодії з RdRp збереглися (Рис. 2.1B, D, F). Щодо сайту зв'язування 1 (Рис. 2.1B) можна сказати, що тут амінокислоти Ile 590, Tyr 690, Leu 577 і Gln 574 є жорсткими, оскільки вони практично не змінювали свого положення у просторі в процесі МД (<0.75 Å). На противагу цьому Lys 578 та Arg 570 характеризуються деякими зміщенням (1.5 Å і 1.6 Å, відповідно). У сайті зв'язування 2 (Рис. 2.1D) C_{60} фулерен затиснутий всередині сайту та упродовж усього часу МД утворює стеричні та стекінг взаємодії з Leu 372, Leu 515, Phe 369 і Trp 510. Примітно, що упродовж усієї траєкторії МД зміщення ключових амінокислот (наприклад: Phe 369, Trp 510, Tyr 516, Leu 315 і Leu 367) є мінімальними і не перевищують 1 Å. Нарешті, для сайту зв'язування 3 (Рис. 2.1F) спостерігається така картина зв'язування: C_{60} фулерен змістився всередину сайту та міцно зафіксувався завдяки взаємодії з навколишнім амінокислотним середовищем. C_{60} фулерен утворює стекінг та стеричні взаємодії з Phe 397 and Val 399, Ala 384, Val 331 і Thr 325. Ці взаємодії стали можливими завдяки рухливості деяких амінокислот цього сайту зв'язування: Phe 397 (4.9 Å), Val 399 (3.5 Å) і Ala 384 (3.2 Å). Інші амінокислоти - Val 331 та Thr 235 - є практично нерухомими (зміщення становить приблизно 0.5 Å).

На наступному етапі, як для 3CLpro, так і RdRp, оцінили енергію зв'язування із C_{60} фулереном за використання методу MMPBSA у програмному пакеті g_mmpbsa toll [9] відповідно до наступного рівняння [10, 11]



Рисуеок 2.1. - Результати молекулярного докінгу (A, C, E) та МД (B, D, F) комплексу між C_{60} фулереном (сірий колір) та кишені зв'язування RdRp (жовтий колір): A, B - кишеня 1; C, D - кишеня 2; E, F - кишеня 3.

$$G_{binding} = G_{complex} - (G_{protein} + G_{ligand}),$$

де $G_{complex}$ - загальна вільна енергія зв'язування "C_{60}-3CLpro/RdRp" комплексу, $G_{protein/ligand}$ - загальна вільна енергія ізольованого C_{60} фулерену/протеїну.

Також ця методика була застосована для аналізу картини зв'язування C_{60} фулерену з досліджуваними протеїнами, а саме в рамках методики MMGBSA [12, 13]. Для обох випадків використали усі снепшоти з траєкторії МД тривалістю 50 нс.

Результати потенційної афінності C_{60} фулерену щодо протеїнів 3CLpro та RdRp наведені в Табл. 1. Як бачимо, у випадку з 3CLpro та RdRp (сайт зв'язування 3) взаємодія із C_{60} фулереном є більш вигідною порівняно із сайтами зв'язування 1 та 2. Крім того, з Табл. 1 можна оцінити внесок інших енергій у зв'язування досліджуваних протеїнів із C_{60} фулереном. Так, наприклад, величина E_{vdW} дає найбільший внесок у зв'язування C_{60} фулерену із 3CLpro та RdRp порівняно з іншими складовими. Крім того, частина наведених енергій (E_{elect}, G_{polar} і $G_{nonpola}$) є більшими чи близькими до нуля, що вказує на їх негативний вплив на комплексоутворення між C_{60} фулереном та 3CLpro/RdRp протеїнами.

Таблиця. 1 Результати MMPBSA дослідження.

Вклад (kJ/mol)	**3CLPro**	**RdRp**		
		Pocket 1	**Pocket 2**	**Pocket 3**
E_{vdW}	-204.275±18.0	-164.9±16.7	-126.3±20.9	-178.9±13.4
E_{elect}	-0.016±1.4	0.08±2.3	-0.185±1.15	0.007±1.951
G_{polar}	60.8±9.4	46.1±9.5	21.1±12.8	34.1±4.4
$G_{nonpolar}$	-15.8±1.4	-12.8±1.2	-9.9±1.5	-13.8±1.2
$G_{binding}$	-159.3±15.2	-131.5±15.3	-115.4±23.8	-158.5±12.5

Відповідно до результатів MMGBSA (Рис. 2.2), найбільший позитивний вплив на комплексоутворення між C_{60} фулереном та 3CLpro/RdRp протеїнами створюють амінокислоти, які здатні утворювати стекінг взаємодії. Наприклад, у випадку з 3Clpro, His 41 та Cys 145 мають позитивний вплив на зв'язування, енергія зв'язування становить -4.63 і -3.88 kJ/mol, відповідно. Саме завдяки

цьому, ймовірно, C_{60} фулерен вбудовується у каталітичний сайт зв'язування 3CLpro. Однак, внесок каталітичної діади у зв'язування із C_{60} фулереном не є найбільшим. Так, енергетика зв'язування зі значною кількістю амінокислот є наступною: Met 49 (-5.54 kJ/mol), Met 165 (-8.18 kJ/mol), Leu 50 (-3.99 kJ/mol), Gly 143 (-2.58 kJ/mol), Asp 187 (-2.83 kJ/mol) і Gln 189 (-5.25 kJ/mol). Щось подібне спостерігається і для зв'язування C_{60} фулерену з RdRp. Так, наприклад, у випадку із сайтом зв'язування 1 C_{60} фулерен взаємодіє з Ile 49 (-5.78 kJ/mol), Asn 497 (-2.67 kJ/mol), Leu 557 (-6.89 kJ/mol), Lys 578 (-5.71 kJ/mol), Ala 581 (-4.68 kJ/mol), Ile 590 (-2.65 kJ/mol) і Gly 591 (-2.89 kJ/mol). Водночас, Arg 570 виштовхує C_{60} фулерен із сайту зв'язування (подібна картина спостерігається у всіх випадках, крім зв'язування C_{60} фулерену з RdRp у сайті зв'язування 2). А у випадку з 3CLpro Arg 40 також має негативний вплив на комплексоутворення.

3 Дизайн нанокластера C_{60} фулерену та оптимально можливих комплексів між ним і протеїнами-мішенями за використання методу молекулярної динаміки

Для дослідження поведінки C_{60} фулерену у воді (його агрегації) у декілька боксів, залитих водою, додали рандомно у різних концентраціях цю молекулу. Всі розрахунки проводили у програмному пакеті Gromacs 2020 [6] та силовому полі Charmm36 [7]. Ключові етапи розрахунків складалися з таких основних етапів: мінімізація енергії, два кроки еквілібрації системи (NVT і NPT) та МД тривалістю 100 нс.

Виявили, що на початкових етапах МД C_{60} фулерен формує незначні кластери розміром 7-16 молекул (Рис. 3.1; див. 5% розчин, 25 нс). Хоча зазначимо, що на розмір кластеру, утвореного за той чи інший час, також впливає вихідна концентрація C_{60} фулерену в розчині (Рис. 3.1; див. 10 і 15% розчини, 25 нс). Так, у випадку більшої вихідної концентрації C_{60} фулерену, крім незначних за розміром агрегатів, утворюються кластери розміром 25 і більше молекул C_{60}. Цікавим є те, що кластери розміром до 16 молекул здебільшого мають сферичну

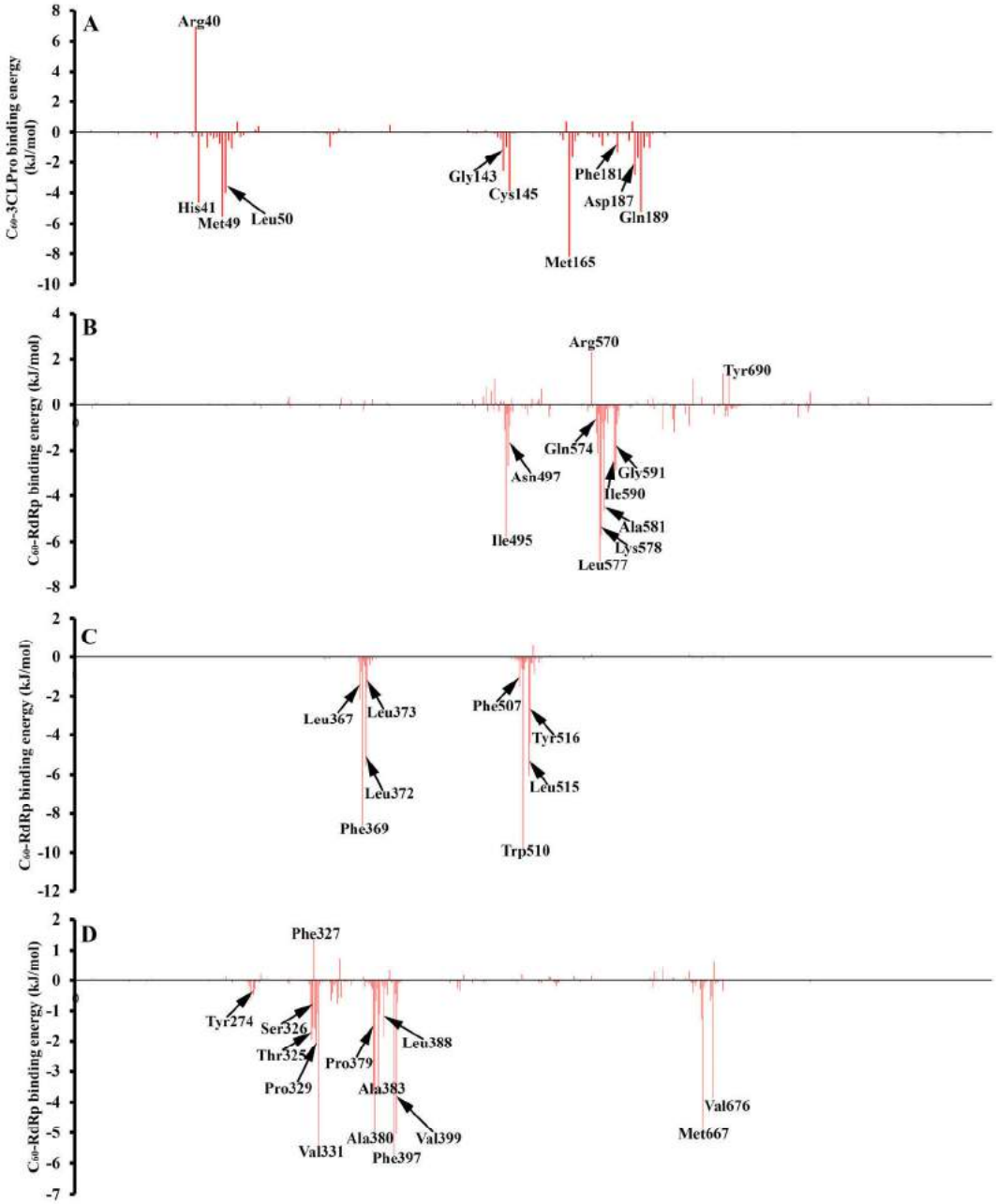


Рисунок 2.2. - Розкладання енергії зв'язку за внесками досліджуваних комплексів: "C_{60}-3CLpro" (A); "C_{60}-RdRp" кишеня 1 (B); "C_{60}-RdRp" кишеня 2 (C); "C_{60}-RdRp" кишеня 3 (D).

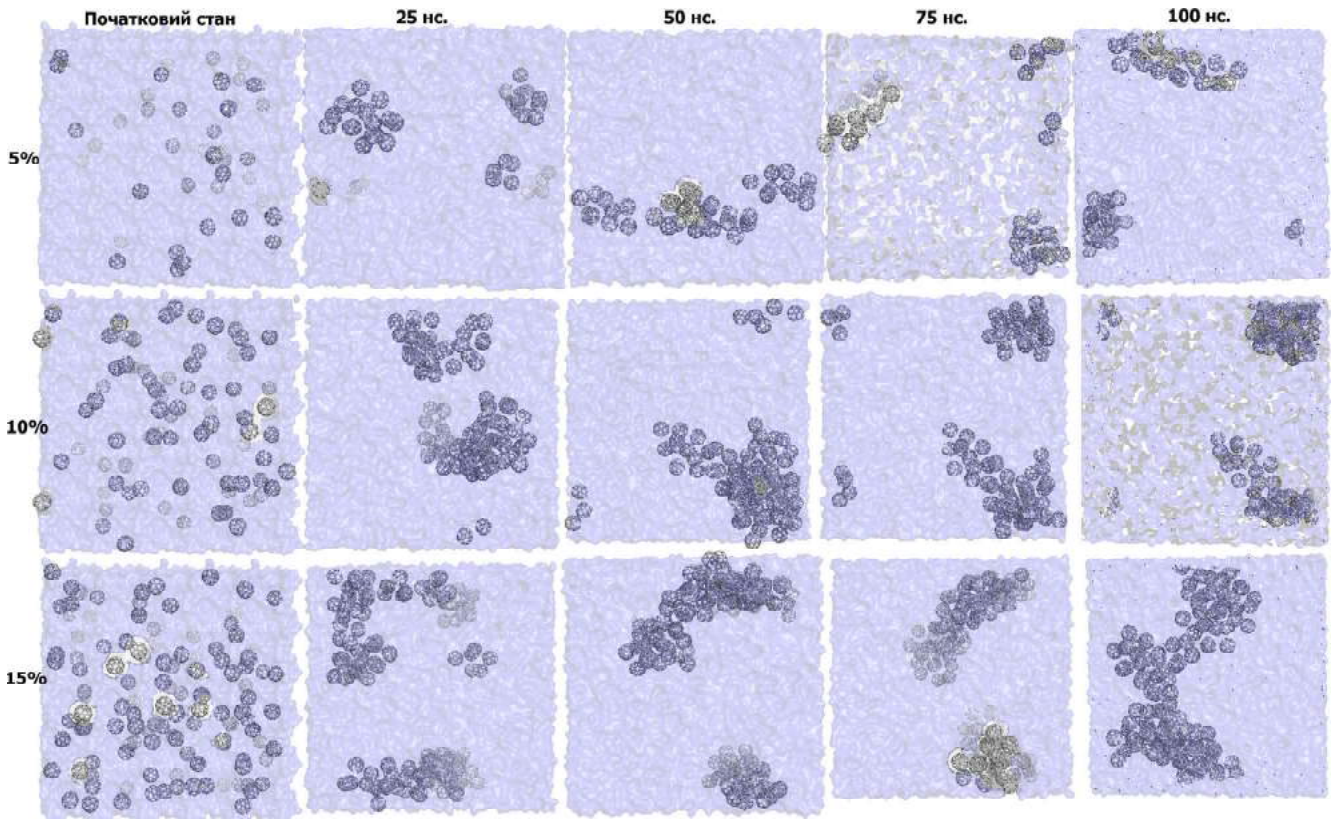


Рисунок 3.1. - Вигляд зверху боксів з різною концентрацією C_{60} фулерену у воді у процесі МД. C_{60} фулерен – сірий колір, бокс води – блакитний колір.

форму або наближену до такої (Рис. 3.1; див. 5% розчин, 25 нс), а у кластерів більшого розміру форма є неправильною (Рис. 3.1). Це пов'язано з тим, що кластери більшого розміру є більш рухливими і мають більшу ентропійну складову, яка і не дає можливості їм набути сферичної форми.

Наступні снепшоти у динаміці чітко показують, що утворені початкові кластери у всіх випадках зростають за розміром і відрив якоїсь незначної частини від великого кластера є малоймовірним. З цього можна зробити висновок, що у кінцевому варіанті усі молекули C_{60} у розчині здатні утворити один великий кластер, фактично ізольовоний від водного середовища. Що цікаво, у такому випадку біологічні ефекти C_{60} фулерену повинні бути поставлені під питання, але згідно розрахунків [14, 15] при проходженні чрез клітинну мембрану великі кластери C_{60} фулерену (25 і більше молекул) застряють у ній, а проникають через мембрану лише поодинокі молекули C_{60}, які і взаємодіють з деяким спектром

протеїнових таргетів всередені клітини. Хоча тут потрібно відзначити, що існує значна ймовірність того, що C_{60} фулерени всередені клітини також утворюють нові кластери, які за розміру до 10 молекул потенційно здатні таргетувати протеїни, зокрема RdRp та 3CLpro.

Висновки

Приготовлено та охарактеризовано C_{60}ВРФ максимальної концентрації 0,6 мг/мл за використання оригінальної ультразвукової технології, СЕМ, СТМ і АСМ мікроскопії та спектроскопічного методу ДРС. Показано, що C_{60}ВРФ містить як поодинокі молекули C_{60}, так і їх сферичні агрегати розміром 1,5-115 нм (при цьому значна частина припадає на наночастинки діаметром 47 нм.). Значення дзета-потенціалу для C_{60}ВРФ складало -24,5 мВ, що свідчить про його високу стабільність. Здійснено дизайн потенційних комплексів «C_{60}-протеїн коронавірусу SARS-CoV-2» в імітованому клітинному середовищі за використання методів МД та молекулярного докінгу. Відповідно до результатів молекулярного докінгу C_{60} фулерен повністю заповнює відібрані три потенційних сайти зв’язування протеїну RdRp і, більш того, є затиснутим там різноманітними стекінг та стеричними взаємодіями. За результатами МД ключові взаємодії з протеїном RdRp зберігаються для усіх сайтів зв’язування. Для протеїнів 3CLpro і RdRp оцінили значення енергії зв’язування із C_{60} фулереном за використання методів MMPBSA та MMGBSA. Нарешті, здійснено дизайн потенційних нанокластерів C_{60} фулерену у водному середовищі та проаналізовано їх здатність таргетувати протеїни RdRp та 3Clpro і, таким чином, пригнічувати функціональну активність коронавірусу SARS-CoV-2.

Перелік джерел посилання

1. Ritter U., Prylutskyy Y.I., Evstigneev M.P., Davidenko N.A., Cherepanov V.V., Senenko A. I., Marchenko O.A., Naumovets A. G. Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct., 2015, V. 23, P. 530–534.
2. Scharff P., Risch K., Carta-Abelmann L., Dmytruk I.M., Bilyi M.M., Golub O.A., Khavryuchenko A.V., Buzaneva E.V., Aksenov V.L., Avdeev M.V., Prylutskyy Yu.I., Durov S.S. Structure of C_{60} fullerene in water: spectroscopic data. Carbon, 2004, V. 42, P. 1203–1206.
3. Chen Yu., Liu Q., Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. J. Med. Virol. 2020. https://doi.org/10.1002/jmv.25681
4. Warren G.L., Andrews C.W., Capelli A.M. A critical assessment of docking programs and scoring functions. J. Med. Chem., 2006, V. 49, P. 5912-5931.
5. McMartin C., Bohacek R.S. QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. J. Comput. Aided Mol. Des., 1997, V. 11, P. 333-344.
6. Abraham M.J, Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftWareX, 2015, V. 1-2, P. 19-25.
7. Huang J., MacKerell A.J. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. J. Comput. Chem., 2013, V. 34, P. 2135-2145.
8. Zoete V., Cuendet M.A., Grosdidier A. SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. J. Comput. Chem., 2011, V. 32, P. 2359-2368.
9. https://rashmikumari.github.io/g_mmpbsa/
10. Kollman P.A., Massova I., Reyes C., Kuhn B. Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. Acc. Chem. Res., 2000, V. 33, P. 889–897.
11. Kumari R., Kumar R., Lynn A. *g_mmpbsa*—A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. J. Chem. Inf. Model., 2014, V. 54, P. 1951–1962.
12. Gohlke H., Kiel C., Case D.A. Insights into Protein–Protein Binding by Binding Free Energy Calculation and Free Energy Decomposition for the Ras–Raf and Ras–RalGDS Complexes. J.Mol. Biol., 2003, V. 330, P. 891-913.
13. Yan C., Xiu Z., Li X., Li S., Hao C., Teng H. Comparative molecular dynamics simulations of histone deacetylase-like protein: Binding modes and free energy analysis to hydroxamic acid inhibitors. Proteins, 2008, V. 73, P. 134-149.
14. Xie L., Liu Y., Xi Z., Li H., Liang S., Zhu K. Computer simulations of the interaction of fullerene clusters with lipid membranes. Mol. Simul. 2017, V. 43, P. 1532-1538.
15. Montero-Alejo A.L., Menéndez-Proupin E., Fuentes M.E., Delgado A., Montforts F.P., Montero-Cabrera L.A., García de la Vega J.M. Electronic excitations of C_{60} aggregates. Phys. Chem. Chem. Phys., 2012, V. 14, P. 13058-13066.

Етап 2 (2021 р.): Оцінка стабільності одержаних комплексів «C_{60} нанокластер-протеїн» в імітованому клітинному середовищі методами молекулярної динаміки, їх вільної енергії та внеску кожної амінокислоти у зв'язування між нанокластером C_{60} фулерену і протеїном. Оцінка проникності C_{60} фулерену/його нанокластера крізь ліпопротеїнову оболонку коронавіруса за використання методу молекулярної динаміки. Приготування C_{60}ВРФ заданої концентрації за використання оригінальної ультразвукової технології та його первинне характеризування спектроскопічними методами (УФ-Вид і КРС). Дослідження структурної самоорганізації водного колоїдного розчину C_{60} фулерену залежно від концентрації (форма та розмір частинок) за використання мікроскопічних (СЕМ, АСМ і СТМ) та спектроскопічного (ДРС) методів

1 Приготування і характеризування водного колоїдного розчину C_{60} фулерену (C_{60}ВРФ)

1.1 Приготування C_{60}ВРФ заданої концентрації та його первинне характеризування спектроскопічними методами (УФ-Вид і КРС)

З метою одержання C_{60} фулеренів спалювали графітові стержні у дузі постійного струму в атмосфері гелію за температури 6000 ^{0}С. Очищення C_{60} фулеренів здійснювали за допомогою методу гель-хроматографії з використанням як елюєнта органічного розчинника толуолу та високоефективної рідинної хроматографії (Jasco PU-2086, ФРН).

Для отримання водного розчину C_{60} фулерену (C_{60}ФВР) був застосований метод, який грунтується на переведенні молекул C_{60} з толуолу у воду з подальшим обробленням ультразвуком (частота 8 Гц, тривалість 8 год) [1]. Для цього змішували насичений розчин чистого C_{60} фулерену в толуолі (чистота >99,5%), де його концентрація відповідає максимальній розчинності ~2,9 мг/мл, та однаковий об'єм дистиляту у відкритому стакані. Дві утворені водні фази піддавали дії ультразвуку. Процедуру виконували до повного випаровування толуолу і набуття водною фазою жовтого забарвлення (рис. 1.1). Фільтрацією водного розчину відділяли потрібний продукт від нерозчиненого C_{60} фулерену. За допомогою цього методу вдається отримати різні його концентрації у воді — від 0,01 до 2,6 мг/мл. Отриманий C_{60}ФВР (максимальна концентрація 0,15 мг/мл) є типовою

Рисунок 1.1. - C_{60}ВРФ (0,15 мг/мл).

молекулярно-колоїдною системою, яка стабільна упродовж 12-18 місяців за температури +4 ^{0}C (Рис. 1.1). До складу цього розчину стабілізатори не входять.

Далі вимірювали спектри поглинання C_{60} фулерену у воді за різних концентрацій у діапазоні довжин хвиль λ=200–700 нм за кімнатної температури. Як виявляється, в УФ-ділянці спектра домінують три інтенсивні широкі смуги поглинання з максимумами при 208, 265 і 347 нм. Метод комбінаційного розсіяння світла (КРС) виявив інтенсивну смугу на частоті 1467 см$^{-1}$. Таким чином, використання спектроскопічних методів, зокрема УФ-Вид і КРС, підтвердило присутність поодиноких молекул C_{60} у воді за характерними коливальними модами [1-2].

1.2 Дослідження структурної самоорганізації C_{60}ВРФ залежно від концентрації (розмір частинок та значення дзета-потенціалу) за використання спектроскопічного методу (ДРС)

Розподіл частинок C_{60} фулерену за розміром у водних розчинах та значення дзета-потенціалу визначали методом динамічного розсіяння світла (ДРС) на лазерному кореляційному спектрометрі ZetaSizer-3 (Malvern Instruments, Великобританія), обладнаний He-Ne лазером ЛГН-111 (потужність Р=25 мВт, довжина хвилі збудження λ=633 нм). Діапазон вимірювання приладу становить від 1 нм до 20 мкм. Робота спектрометра базується на аналізі кореляційних

характеристик флуктуації інтенсивності розсіяного світла при проходженні лазерного променя через середовище.

Досліджувану водну суспензію в об'ємі 1 мл поміщали у циліндричну оптичну кварцову кювету діаметром 10 мм, яку потім вставляли у лунку лазерного кореляційного спектрометра. Реєстрацію лазерного випромінювання, розсіяного від водного розчину частинок, проводили багаторазово упродовж 180 с за температури +22 °С під кутом розсіювання 90°. Отримані результати вимірювань обробляли за допомогою сервісної комп'ютерної програми PCS-Size mode v1.61.

Відносна агломерація молекул C_{60} у водній дисперсії визначається двома основними факторами - способом отримання цих наночастинок і складу біологічного/суспензійного середовища, яке часто містить диспергуючі речовини: тетрагідрофуран, диметилсульфоксид, полівінілпіролідон для забезпечення стабільності водних дисперсій [3]. Крім того, як біологічні рідини організму, так і культуральні середовища характеризується високим вмістом електролітів (солі, амінокислоти, вітаміни), які є необхідними для нормального функціонування організму та клітинного росту, але сприяють агломерації молекул C_{60}. Тому важливим було оцінити розподіл за розміром наночастинок C_{60} фулерену у водних середовищах, які відрізняються за сольовим і протеїновим складом.

Агрегатний стан частинок C_{60} фулерену (концентрація 0,15 мг/мл) оцінювали у водному середовищі без добавок, а також у середовищі RPMI 1640, яке містило 5% ЕТС (ембріональна сироватка теляти).

Важливою складовою досліджень є оцінка концентраційної залежності ефектів наночастинок. Розподіл за розміром частинок C_{60} фулерену вивчали в середовищі RPMI 1640 з 5% ЕТС при внесені C_{60} фулерену за концентрацій 100 і 200 мкМ. Культуральне середовище RPMI 1640 є складною сумішшю, що містить, зокрема, солі, амінокислоти, різні протеїни і ліпіди.

Аналіз кривих, які відображають кількість частинок певного розміру у загальному об'ємі зразка, показав наявність частинок розміром у діапазоні від 20 до 450 нм у середовищі RPMI 1640 із 5% ЕТС за присутності 100 мкМ C_{60}

фулерену (Рис. 1.2). Однак суттєвої агломерації не відбувалося: як у RPMI 1640, так і водному розчині переважають наночастинки із середнім діаметром 50 нм (див. попередній звіт). Водночас, двократне збільшення концентрації C_{60} фулерену у середовищі RPMI супроводжується помітним посиленням агломерації. Крива, яка характеризує розподіл частинок за розміром, зміщується вправо у діапазон від 40 до 600 нм і має два піки - 60 і 413 нм (Рис. 2).

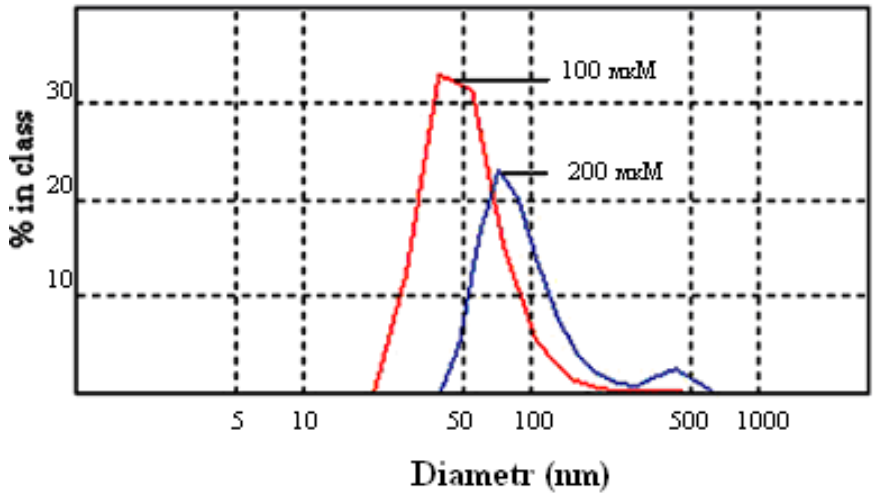


Рисунок 1.2. Динамічне світлорозсіювання C_{60} фулеренів у середовищі RPMI 1640 з 5% ЕТС за різної концентрації.

Таким чином, при внесенні 100 мкМ C_{60} фулерену у середовище, яке є наближене за складом до біологічних рідин, не спостерігається значної агломерації частинок. Це узгоджується з гіпотезою [3] відносно того, що включення компонентів протеїнової та ліпідної природи до складу середовища є умовою оптимального диспергування карбонових наночастинок у біологічних системах. Критичним фактором, який сприяє агломерації наночастинок C_{60} фулерену, є підвищення його концентрації у середовищі.

Значення дзета-потенціалу для C_{60}ВРФ складало -27,0 мВ за кімнатної температури, що свідчить про його високу стабільність.

Отримані результати ДРС показали, що C_{60}ВРФ є гомогенним, стабільним та полідисперсним, у якому переважно містяться агломерати з гідродинамічним

діаметром від 12 до 120 нм, при цьому значна частина (30%) припадає на наночастинки діаметром 50 нм.

1.3 Дослідження структурної самоорганізації C_{60}ВРФ залежно від концентрації (форма та розмір частинок) за використання мікроскопічних методів (СЕМ, АСМ і СТМ)

Для вивчення структурного стану C_{60} фулерену ми використали методи атомно-силової (АСМ), сканувальної електронної (СЕМ) і сканувальної тунельної (СТМ) мікроскопії, чутливість яких дозволяє розрізняти нанорозмірні об'єкти, зокрема мономолекулярні шари та окремі молекули на поверхні атомно-гладенької твердої підкладки. Для приготування зразків краплю розчину із C_{60} фулереном наносили на поверхню підкладки, а вимірювання проводили після повного випаровування розчинника.

АСМ вимірювання виконували на підкладці слюди. Безпосередньо перед нанесенням розчину робився свіжий скол підкладки, що забезпечувало чисті умови експериментів. Дослідження були проведені на приладі «Solver Pro M» (NT-MDT, Росія) у напівконтактному режимі з використанням АСМ зондів типу "RTESPA-150" (150 кГц, 5 – 10 Н/м, R_{max} = 12 нм). СЕМ і СТМ вимірювання виконані на підкладках золота, напиленого на слюдяну основу. Для отримання атомно-гладенької реконструйованої поверхні Au(111) підкладки відпалювали у полум'ї газового пальника перед нанесенням плівки. Для коректного визначення товщини нанесеного шару та форми об'єктів методами АСМ і СТМ підбирали таку поверхневу концентрацію, за якої шар C_{60} фулерену лише часткове покривав підкладку.

Ми охарактеризували свіжеприготовлений C_{60}ВРФ та вперше дослідили розчин C_{60} фулерену у DMSO (диметилсульфоксид). Метод СЕМ показав рівномірний розподіл осадженого матеріалу по поверхні без субмікронних скупчень.

При дослідженні шарів, осаджених із C_{60}ВРФ, на АСМ зображеннях виявлено монодисперсну по товщині плівку у вигляді суцільної сітчастої

суперструктури та окремих острівців (Рис. 1.3). Виходячи з товщини плівки (~ 1,1 нм), можна зробити висновок про об'єднання молекул C_{60} у моношар. Це принципово відрізняється від наших попередніх результатів, де при осадженні із C_{60}ВРФ ми спостерігали ізольовані хаотично розміщені по поверхні окремі молекули C_{60} або їх кластери діаметром до 3 нм. Така поведінка була пояснена силами елекростатичного відштовхування, які запобігають злипанню молекул C_{60}. Отже можна припустити, що у досліджуваному C_{60}ВРФ присутня домішка, яка утворює позитивно заряджені іони, які у розчині нейтралізують негативний заряд молекул C_{60}. Завдяки цьому при осадженні на поверхню підкладки останні можуть зближатись на відстані, де сили притягання Ван-дер-Ваальса домінують над силами елекростатичного відштовхування, що і призводить до утворення суцільного моношару. Окрім молекул C_{60}, до його складу входять молекули домішки, які призводять до збільшення загальної товщину шару з 0,7 нм до 1,1 нм.

Таку ж незвичну структурну самоорганізацію C_{60} фулерену спостерігали і при СТМ дослідженнях C_{60}ВРФ. Вимірювання на ділянках з різною поверхневою концентрацією дозволили з'ясувати етапи формування суцільної плівки. На початковому етапі в осадженому шарі чітко вирізняються дві компоненти: 1) молекули домішки формують окремі нанооствівці неправильної форми висотою ~ 0,3 нм (Рис. 1.4а); 2) на їх тлі виступають окремі молекули C_{60}, висота яких становить 0,5–0,6 нм. Їх локалізація в межах острівців говорить про активну взаємодію між молекулами C_{60} і домішки. Чисельні горизонтальні "протягування" на рис. 1.4а (обведені пунктирними лініями) свідчать про низьку електропровідність домішки, що призводить до зриву тунелювання і пошкодження острівців вістрям СТМ зонду. Із збільшенням поверхневої концентрації відбувається злиття острівців та їх щільне заповнення молекулами C_{60}. У результаті формується суцільна плівка товщиною 0,5–0,6 нм (Рис. 1.4б). Заниження товщини порівняно з даними АСМ вимірювань може бути пояснене адсорбцією на поверхні Au(111) залишкового шару, а також низькою тунельною прозорістю плівки.

В АСМ дослідженнях шарів, осаджених з DMSO, як і при використанні водних розчинів, виявлена латеральна агрегація молекул C_{60}. Також в обох випадках на АСМ зображеннях спостерігали «великі» агрегати висотою 5–60 нм (Рис. 1.5а). Раніше було показано, що їх утворення пов'язане з тривалістю зберігання розчинів. При цьому виявлені й суттєві відмінності у морфології шарів, осаджених з DMSO. Так, у значній кількості спостерігали кластери висотою 1,3–3 нм (Рис. 1.5б,г), які відповідають 2–4 діаметрам молекули C_{60}.

Замість неперервної сітчастої структури C_{60} фулерени утворювали ізольовані острівці, середній латеральний розмір яких складав від 0,1 до 10 мкм (Рис. 1.5а–г). Як правило, формування острівців відбувалося навколо об'ємних агрегатів, що особливо помітно на рис. 5в,г. Зазубрини на краях острівців вказують на анізотропію їх росту, який задається геометрією молекули C_{60}. Подібним чином виглядали острівці молекул C_{60}, осаджених з фізрозчинів, які ми дослідили раніше [4, 5]. Але в нашому випадку замість іонів солі фізрозчину на латеральну агрегацію може впливати середовище DMSO. Також не можна виключати і вплив домішок, на наявність яких вказує нестабільний режим СТМ вимірювань на шарах, осаджених з DMSO, та наявність на зображеннях чисельних протягувань. Товщина острівців варіювалася в межах 0,8–1,2 мкм залежно від їх латеральних розмірів (Рис. 1.5). На її величину може впливати наявність під острівцем молекул домішки або залишкового шару DMSO.

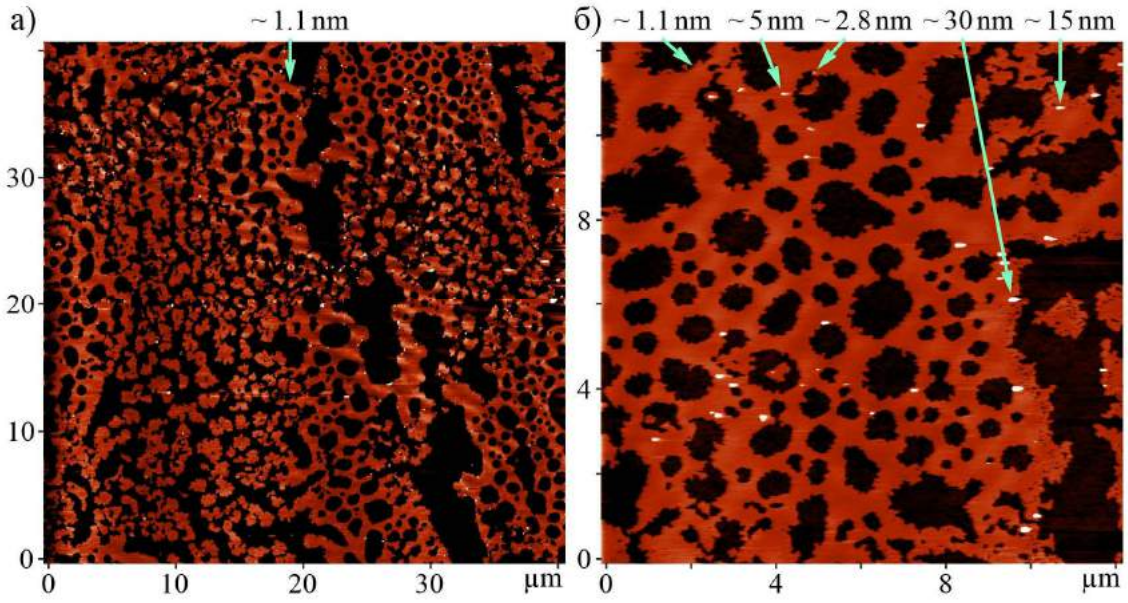


Рисунок 1.3. - АСМ-зображення шару C_{60} фулерену, осадженого із C_{60}ВРФ на поверхню слюди. Числами при стрілочках вказано товщину шару і висоти агрегатів.

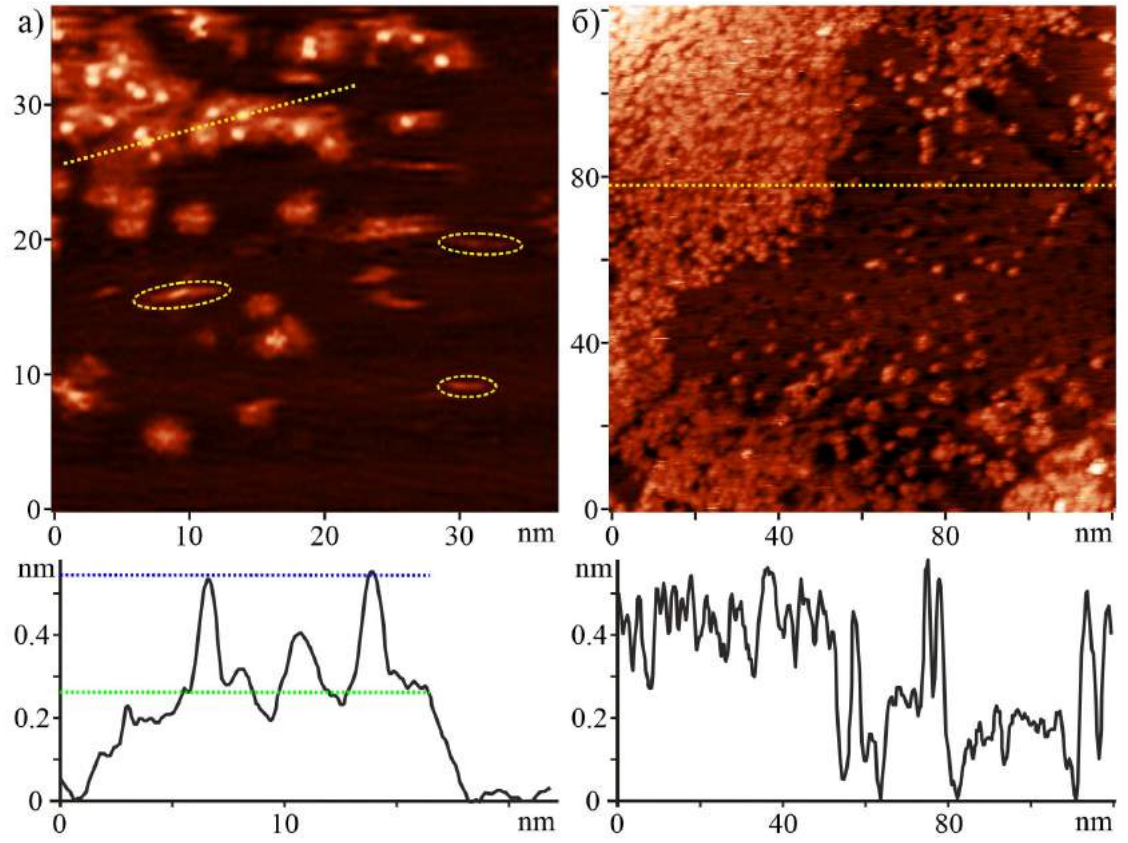


Рисунок 1.4. - СТМ-зображення шару C_{60} фулерену, осадженого із C_{60}ВРФ на поверхню Au(111), та їх *Z*-перетини вздовж ліній, позначених на зображеннях.

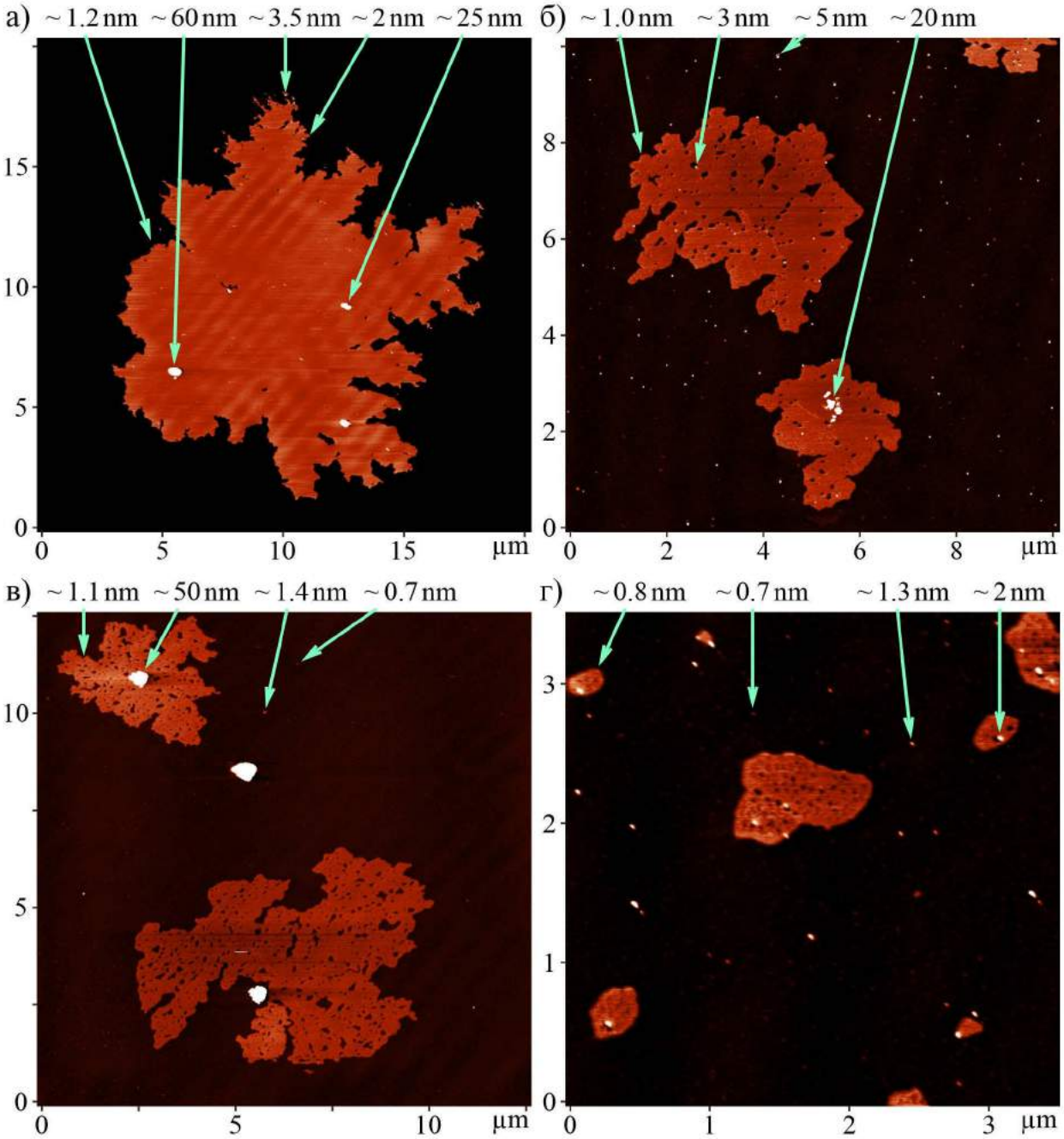


Рисунок 1.5. - АСМ-зображення шару C_{60} фулерену, осадженого з DMSO на поверхню слюди. Числами при стрілочках вказано висоти острівців і агрегатів.

2 Оцінка стабільності одержаних комплексів «C_{60} нанокластер - протеїн» в імітованому клітинному середовищі методами молекулярної динаміки і докінгу

2.1 Дослідження структурної організації рецепторного білка ACE2 за використання методу молекулярної динаміки

Для дослідження структурної організації мембранного білка ACE2 використали усі наявні дані Protein Data Bank (RCSB PDB) [6]. Зазначимо, що структуру білка ACE2 детально вивчали з метою з'ясування його можливих механізмів зв'язування з потенційними лігандами. Для дослідження застосували PDB структуру 6m17 (The 2019-nCoV RBD/ACE2-B0AT1 complex) [7]. Спочатку всі молекули води та природні ліганди були видалині зі структури ACE2. Потім, перед поверхневим аналізом протеїну-мішені та виявленням потенційних кишень зв'язування для C_{60} фулерену, до білку додали усі відсутні атоми гідрогену та провели корекцію протонування амідів та бічних ланцюгів відповідно до клітинного рівня pH. Далі провели енергетичну мінімізацію досліджуваної структури. Потенційні кишені зв'язування визначили за допомого «cavity computational algorithm» у програмному пакеті Caver [8]. Як результат, виявили три потенційних сайти зв'язування для C_{60} фулерену, представлені на Рис. 2.1. Наявні літературні дані свідчать, що шляхом зв'язування ліганда у борозні PD (пептидазний домен) можна заблокувати стабільне функціонування білка ACE2 і, як наслідок, його взаємодію із S-протеїном SARS-CoV-2 [9-11].

Отже, при поверхневому аналізі ACE2 протеїну виявили три потенційних сайти зв'язування між жолобком PD і C_{60} фулереном. Усі сайти зв'язування характеризуються присутністю у своїй структурі амінокислот, які здатні утворювати міцні стекінг або катіон-π взаємодії з окремим C_{60} фулереном або з таким у складі нанокластеру.

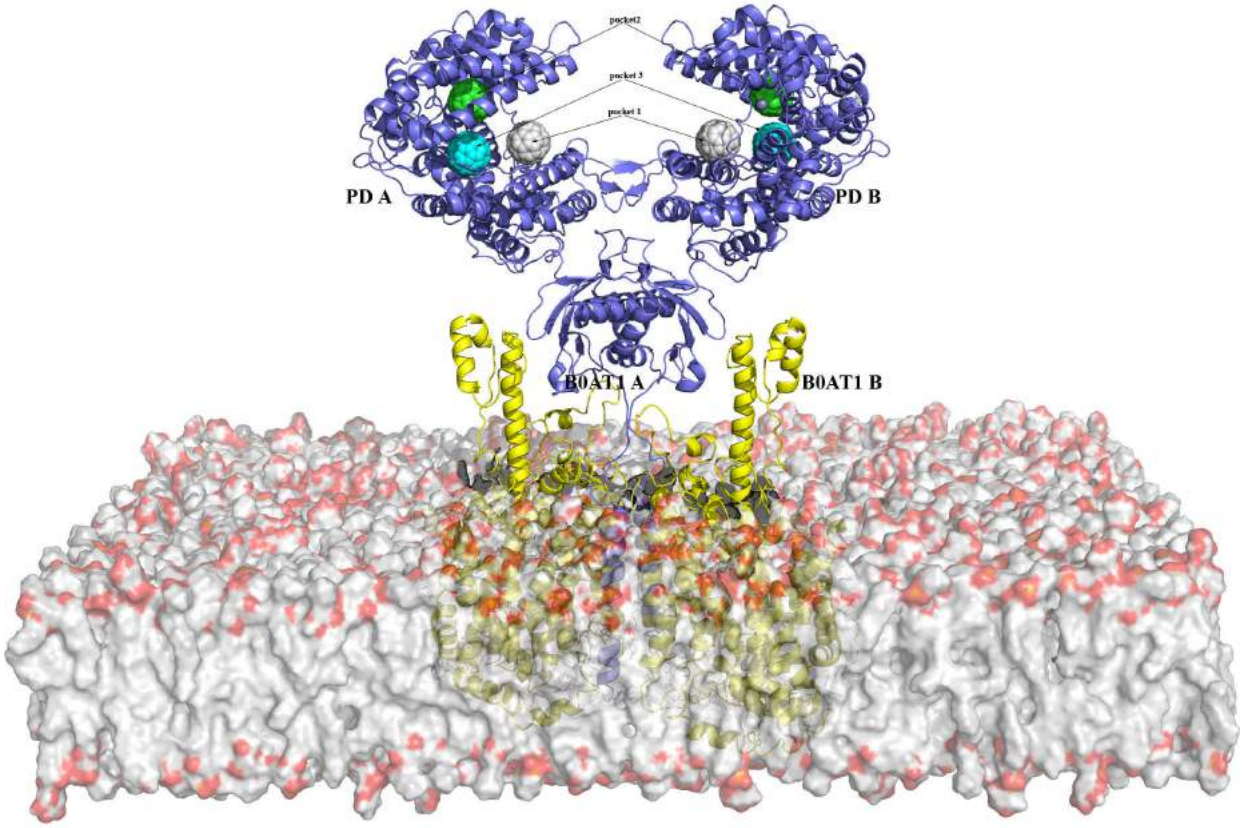


Рисунок 2.1. - Зображення вбудованого білка ACE2 у мембрану з виділеними структурними елементами та потенційними сайтами зв'язування для C_{60} фулерену. C_{60} фулерен показано сірим, блакитним та зеленим кольорами; мембрана – сірим кольором; B0AT1 структура – жовтим; PD – фіолетовим.

2.2 Дослідження взаємодії C_{60} фулерену з білком ACE2 за допомогою методів молекулярної динаміки і докінгу

Для молекулярного докінгу використали жорстку молекулу ACE2 та гнучку молекулу C_{60}. Застосували вбудований у QXP алгоритм систематичного докінгу (sdock+) [12]. Максимальна кількість кроків розрахунку складала 300, найкращі три «C_{60}-ACE2» комплекси, виходячи з внутрішніх скоринг-функцій QXP [12, 13] (контактна поверхня та оптимальна відстань між ключовими амінокислотами ACE2 і C_{60} фулереном), відібрали для подальших досліджень.

Згідно результатів молекулярного докінгу (Рис. 2.2A, C, E) у всіх випадках C_{60} фулерен щільно заповнює сайти зв'язування та утримується там за рахунок різноманітних стекінг взаємодій (Рис. 2.2, 2.3A). Так, сайт зв'язування 1 характеризується утворенням стекінг взаємодій з Phe 504, His 505, Phe 274, Tyr

127, Trp 271 та катіон-π взаємодії з Arg 273. Крім того, тут спостерігається стерична взаємодія з Asn 149. Подібна картина має місце у сайті зв'язування 2: тут C_{60} фулерен утворює стекінг із Trp 349 та His 401. Зазначимо, що стабільність такого комплексу потенційно є меншою за попередній варіант, оскільки тут C_{60} фулерен затиснутий ароматичними амінокислотами лише з одного боку, що може спричинити його витіснення із сайту зв'язування (Рис. 2.3C). Сайт зв'язування 3 відрізняється від двох попередніх тим, що тут C_{60} фулерен є найбільш заглибленим (Рис. 2.3E), хоча, з іншого боку, це може бути причиною руйнування такого комплексу під час проведення молекулярної динаміки (МД). У цьому випадку C_{60} фулерен утворює стекінг взаємодії із Trp 203, Tyr 510, Tyr 202 та катіон-π - з Arg 514 і Lys 562.

Важливо зазначити, що у всіх розглянутих випадках C_{60} фулерен є затиснутим всередині кожного із сайтів зв'язування, що може стати, як причиною подальшого заглиблення C_{60} фулерену у цей сайт (покращення зв'язування), так і причиною виштовхування C_{60} фулерену з того чи іншого сайту зв'язування (руйнування комплексу).

Оцінку стабільності/конформаційних змін отриманих комплексів «C_{60}-ACE2» провели з використанням методу МД. Усі розрахунки виконали у програмному пакеті Gromacs 2020 [14] та силовому полі Charmm36 [15]. Досліджуваний комплекс протонували відповідно до імплементованої у Gromacs 2020 функції "ingh". Топологію для C_{60} фулерену побудували, використовуючи онлайн сервер SwissParam [16]. Для розрахунків використали змішану мембрану, яка містить POPC (phosphatidylcholine), POPI (Phosphatidylinositol), CHL1 (Cholesterol), PSM (palmitoylsphingomyelin), ліпіди у кількості 1024, 199, 360 і 73, відповідно. Для побудови мембрани використали web-ресурс CHARMM-GUI [17]. Після того як дві взаємодіючі системи були об'єднані, їх помістили у квадратний бокс та заповнили його молекулами води (TIP3P). Для імітації клітинного середовища туди додали іони Na^+/Cl^- (їх концентрація у боксі складала 0,15 М). Далі провели мінімізацію енергії системи, а потім - два етапи еквілібрації: (1) NVT (constant Number of particles, Volume, and Temperature) і (2) NPT (constant

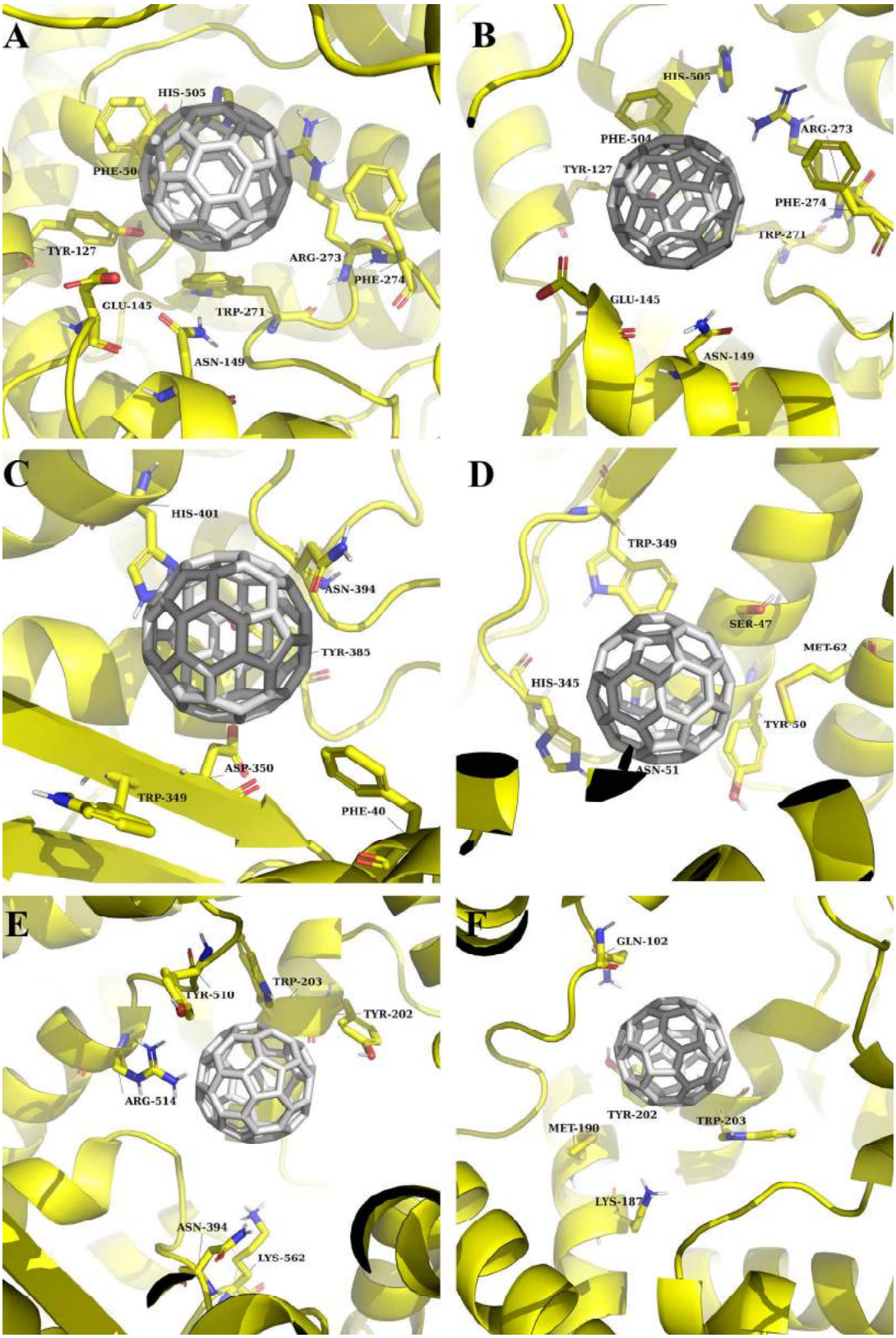


Рисунок 2.2. - Модельні зображення кожного з відібраних в результатті структурного аналізу білка ACE2 сайтів зв'язування. Результати молекулярного докінгу (A, C, E) та МД (B, D, F); у всіх випадках ACE2 – жовтий колір, C_{60} фулерен – сірий колір.

Number of particles, Pressure, and Temperature). Основний етап МД симуляції тривав 50 нс.

За результатами МД отримані комплекси «C_{60}-ACE2» характеризуються значенням RMSD (Root-mean-square deviation) в межах 6 Å. Така їх рухливість повністю корелює з рухливістю незв'язаного ACE2, винятком є лише комплекс 2, де на деяких етапах МД спостерігаються значні відхилиння від інших структур (Рис. 2.3A). Щодо C_{60} фулерену, то тут величина RMSD для комплексів 1 та 3 є однаковою, а для комплексу 2 є значно більшою (Рис. 2.3B). Загалом підчас проведення МД зафіксували наступні ключові зміни у кожному з потенційних сайтів зв'язування. Так, для комплексу 1 спостерігається занурення C_{60} фулерену у сайт зв'язування. За рахунок цього він є затиснутий в амінокислотному середовищі та утворює такі ключові взаємодії: стекінг із Phe 504, His 505, Phe 274, Tyr 127, Trp 271 та катіон-π - з Arg 273. Крім того, відбувається стеричне наближення Asn 149 та Gln 145, з якими є теоретична можливість утворити міцні стеричні взаємодії (Рис. 2.2B). За результатами МД отриманий «C_{60}-ACE2» комплекс 1 є стабільним упродовж усієї траєкторії динаміки.

Щодо сайту зв'язування 2, тут спостерігається руйнування «C_{60}-ACE2» комплексу, оскільки C_{60} фулерен втрачає ключові взаємодії із Trp 349 та His 401 і значно зміщується у борозні PD, після чого фіксуються стекінг взаємодії між Trp 349, His 345 та Met 62. Загалом, з наявної тривалості МД випливає, що «C_{60}-ACE2» комплекс 2 є нестабільним.

У випадку із «C_{60}-ACE2» комплексом 3 спостерігається, як і для комплексу 1, заглиблиння C_{60} фулерену у сайт зв'язування, внаслідок чого втрачається взаємодія з Arg 514 і Tyr 519. Але при цьому C_{60} фулерен знаходиться глибше у сайті зв'язування та з усіх боків міцно затиснутий навколишніми амінокислотами.

Отже, відповідно до результатів молекулярного докінгу та МД доведено, що C_{60} фулерен здатний утворювати стабільні комплекси з ACE2 протеїном («C_{60}-ACE2» комплекси 1 і 3), а відтак - пригнічувати його функціональну активність, що важливо для блокування взаємодії ACE2 із S-протеїном SARS-CoV-2.

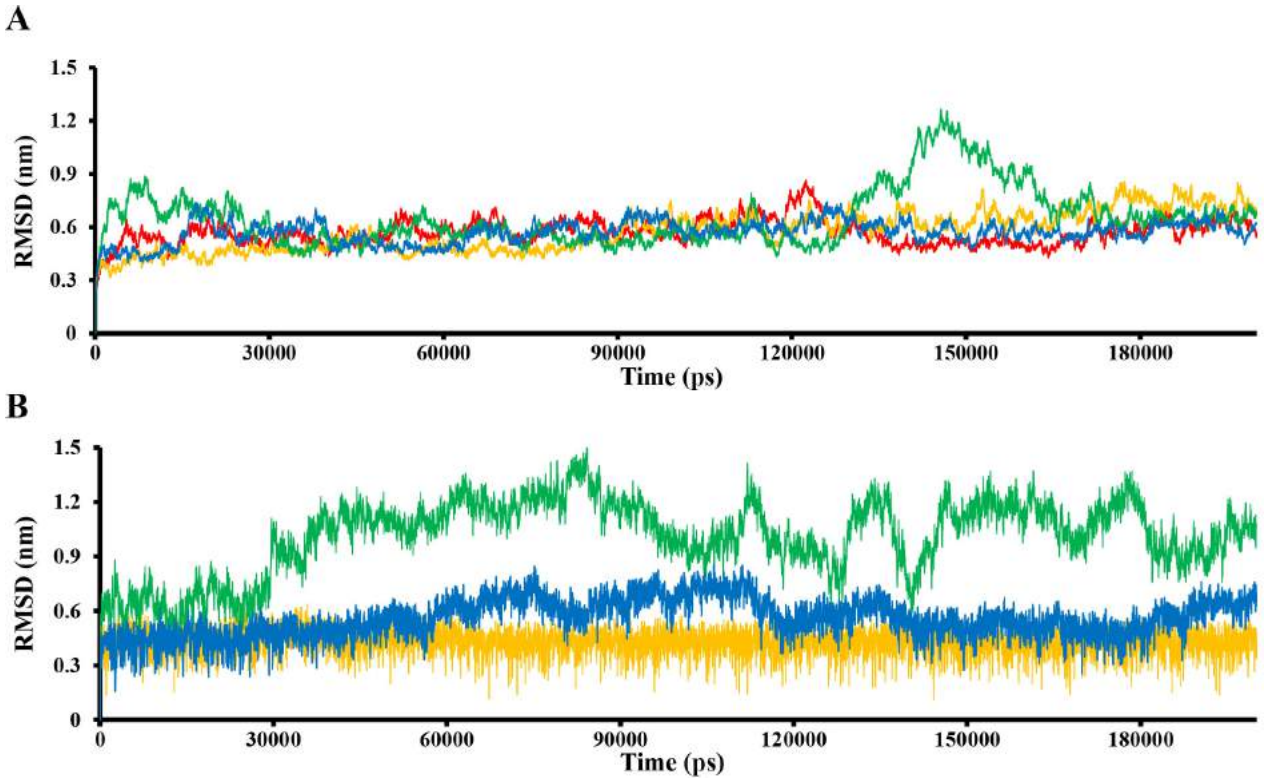


Рисунок 2.3. - Значення RMSD рухливості для білка ACE2 в межах утворених «C_{60}-ACE2» комплексів (A) та C_{60} фулерену (B). У всіх випадках незв'язаній ACE2 червоний колір, кишеня зв'язування 1 – жовтйи колір, кишеня зв'язування 2 – зелений колір, кишеня зв'язування 3 – синій колір.

3 Оцінка проникності C_{60} фулерену/його нанокластера крізь ліпопротеїнову оболонку коронавіруса за використання методу молекулярної динаміки.

Для оцінки здатності C_{60} фулерену/його нанокластера проникати через ліпідну мембрану відповідно до попередньо описаного алгоритму МД підготували систему з тією лише відмінністю, що тут використали не суміш ліпідів, а тільки POPC ліпід. Загалом провели запуск трьох таких систем з кількістю молекул C_{60} 1, 5 і 10 (Рис. 3.1).

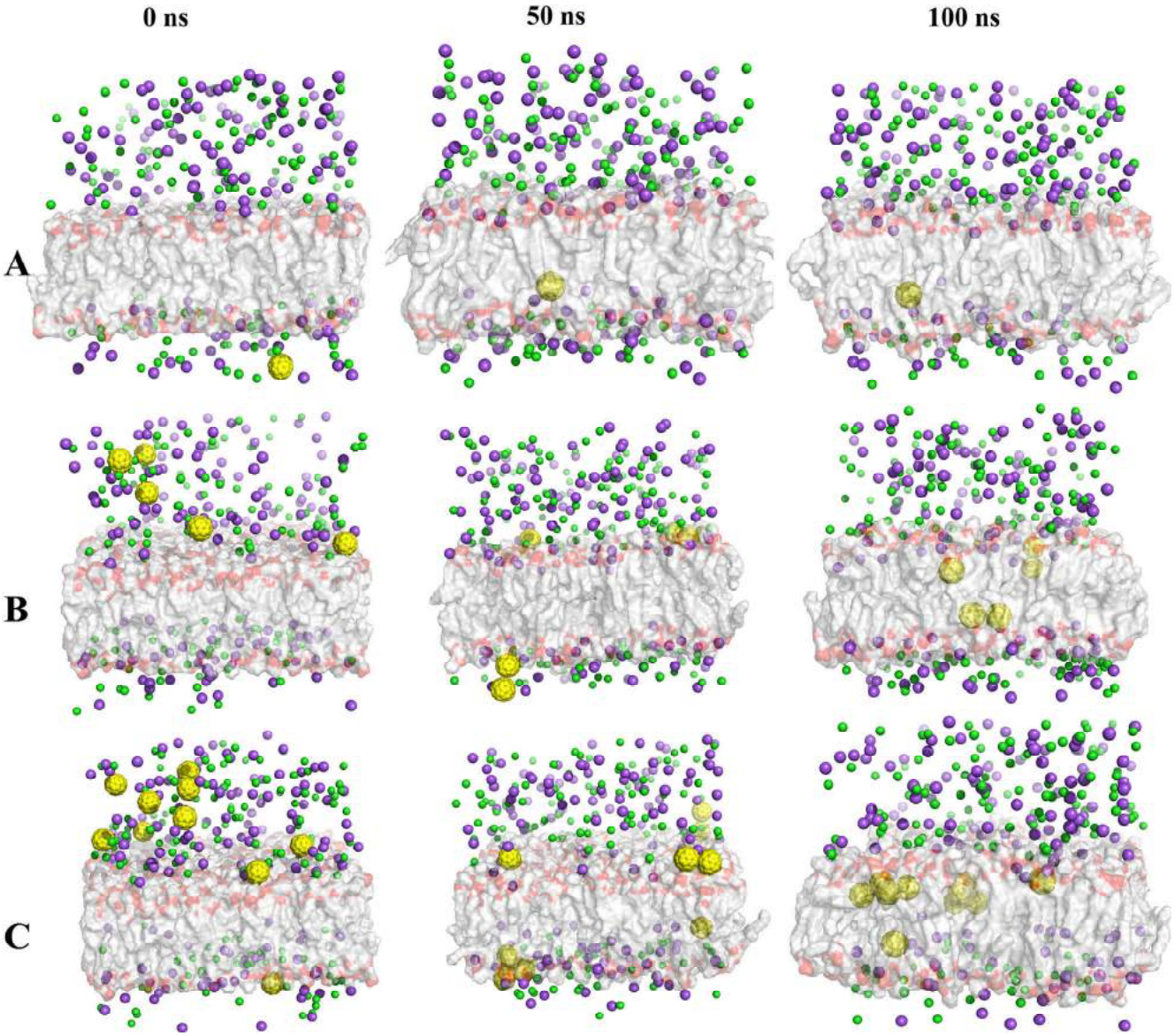


Рисунок 3.1. - Бічний вигляд побудованих систем з різною кількістю молекул C_{60} на різних етапах МД симуляції: POPC мембрана – сірого кольору, C_{60} фулерен – жовтого кольору; A – одна, B – 5 і C – 10 молекул C_{60} у системі, відповідно.

Згідно отриманих результатів C_{60} фулерен здатний заглиблюватися у ліпідну мембрану та далі виходити з неї, що корелює з наявними літературними даними [18, 19]. Так, наприклад, на рис. 9A добре видно, як одна молекула C_{60} повністю заглибилася у мембрану та упродовж МД пересувалася всередині неї.

Дещо цікавіша ситуація спостерігається для систем з 5 та 10 молекул C_{60}. Тут C_{60} фулерен формує кластери з 2, 3 і 4 молекул, які, як виявилося, здатні швидше проникати та виходити з ліпідної мембрани (Рис. 9B, C) [18, 20, 21]. Так, наприклад, на рис. 9C видно утворення рівностороннього трикутника (3 молекули

C_{60}), який починає занурюватися у мембрану, а вже під кінець МД він знаходиться з іншого боку цієї мембрани. На цій же картинці добре видно утворення всередині мембрани тетраедра (4 молекули C_{60}). Інших утворень тут не спостерігалося, хоча згідно літературних даних також можуть утворюватися такі структури, як деформована тригональна біпіраміда і правильна тригональна біпіраміда (5 молекул C_{60}) і деформований октаедр (6 молекул C_{60}) та суперкластери (10 і більше молекул C_{60}) [18, 21].

Підсумовуючи, дослідження переходу наночастинок через мембранні структури є надзвичайно важливим для біомедицини, оскільки напряму стосуються питання біобезпечності їх застосування (тобто можливого впливу наноматеріалів на біологічні системи загалом). Як показано вище, агрегація C_{60} фулерену відбувається або до проникнення у мембрану, або вже у самій мембрані. Отже, можна припустити, що C_{60} фулерени у складі нанокластера, здатні утворювати пори в оболонці коронавірусу SARS-CoV-2, руйнуючи таким чином цілісність його структури, що веде до порушення мембранозалежних стадій циклу реплікації цього вірусу.

Висновки

Приготовлено та охарактеризовано C_{60}ВРФ максимальної концентрації 0,15 мг/мл за використання оригінальної ультразвукової технології, СЕМ, СТМ і АСМ мікроскопії та спектроскопічного методу ДРС. Показано, що C_{60}ВРФ містить як поодинокі молекули C_{60}, так і їх сферичні агрегати розміром 2,8-120 нм (при цьому значна частина припадає на наночастинки діаметром 50 нм). Значення дзета-потенціалу для C_{60}ВРФ складало -27,0 мВ, що свідчить про його високу стабільність. Детально проаналізована структура рецепторного білка ACE2 щодо його можливих механізмів зв’язування із C_{60} фулереном. Зокрема, виявлено три потенційних сайти зв’язування між жолобком PD білка ACE2 і C_{60} фулереном, які характеризуються присутністю у своїй структурі амінокислот, здатних утворювати міцні стекінг або катіон-π взаємодії з окремим C_{60} фулереном або з таким у складі нанокластера. Здійснено дизайн потенційних комплексів «C_{60}-

ACE2» в імітованому клітинному середовищі за використання методів молекулярної динаміки (МД) та докінгу. Доведено, що C_{60} фулерен здатний утворювати стабільні комплекси з ACE2 протеїном, а відтак - пригнічувати його функціональну активність, що важливо для блокування взаємодії ACE2 із S-протеїном SARS-CoV-2. Нарешті, оцінено здатність C_{60} фулерену/його нанокластера проникати через ліпідну мембрану. Відповідно до результатів МД передбачається, що C_{60} фулерени у складі нанокластерів здатні утворювати пори в оболонці коронавірусу SARS-CoV-2, руйнуючи таким чином цілісність його структури, що веде до порушення мембранозалежних стадій циклу реплікації цього вірусу.

Перелік джерел посилання

1. Ritter U., Prylutskyy Y.I., Evstigneev M.P., Davidenko N.A., Cherepanov V.V., Senenko A. I., Marchenko O.A., Naumovets A. G. Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct., 2015, V. 23, P. 530–534.
2. Scharff P., Risch K., Carta-Abelmann L., Dmytruk I.M., Bilyi M.M., Golub O.A., Khavryuchenko A.V., Buzaneva E.V., Aksenov V.L., Avdeev M.V., Prylutskyy Yu.I., Durov S.S. Structure of C_{60} fullerene in water: spectroscopic data. Carbon, 2004, V. 42, P. 1203–1206.
3. Buford M.C., Hamilton Jr.R.F., Holian A. A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. Part. Fibre Toxicol., 2007, V. 4:6. doi:10.1186/1743-8977-4-6.
4. Черепанов В.В., Сененко А.І., Прилуцький Ю.І., Марченко О.А., Наумовець А.Г. Структура плівок немодифікованих фулеренів C_{60}, адсорбованих з фізіологічних розчинів на поверхні слюди і золота. Доповіді НАН України, 2012, № 10, С. 77-82.
5. Prylutskyy Yu.I., Cherepanov V.V., Evstigneev M.P., Kyzyma O.A., Petrenko V.I., Styopkin V.I., Bulavin L.A., Davidenko N.A., Wyrzykowski D., Woziwodzka A., Piosik J., Kaźmierkiewicz R., Ritter U. Structural self-organization of C_{60} and cisplatin in physiological solution. Phys. Chem. Chem. Phys., 2015, V. 17, P. 26084-26092.
6. https://www.rcsb.org/
7. Yan R., Zhang Y., Li Y., Xia L., Guo Y., Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. Science, 2020, V. 367, P. 1444-1448.
8. https://caver.cz/
9. Huentelman M.J., Zubcevic J., Hernández Prada J.A., Xiao X., Dimitrov D.S., Raizada M.K., Ostrov D.A. Structure-Based Discovery of a Novel Angiotensin-Converting Enzyme 2 Inhibitor. Hypertension, 2004, V. 44, P. 903–906.
10. Terali K., Baddal B., Gülcan H.O. Prioritizing potential ACE2 inhibitors in the COVID-19 pandemic: Insights from a molecular mechanics-assisted structure-based virtual screening experiment. J. Mol. Graph. Model., 2020, V. 100: 107697.
11. Basu A., Sarkar A., Maulik U. Computational approach for the design of potential spike protein binding natural compounds in SARS-CoV2. OSF Preprints, 2020. https://doi.org/10.31219/osf.io/j4md2
12. McMartin C., Bohacek R.S. QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. J. Comput. Aided Mol. Des., 1997, V. 11, P. 333-344.
13. Warren G.L., Andrews C.W., Capelli A.M. A critical assessment of docking programs and scoring functions. J. Med. Chem., 2006, V. 49, P. 5912-5931.
14. https://www.gromacs.org/
15. Huang J., MacKerell A.J. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. J. Comput. Chem., 2013, V. 34, P. 2135-2145.
16. Zoete V., Cuendet M.A., Grosdidier A. SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. J. Comput. Chem., 2011, V. 32, P. 2359-2368.
17. https://www.charmm-gui.org/?doc=input/membrane.bilayer

18. Zhang S., Mu Y., Zhang J.Z.H., Xu W. Effect of Self-Assembly of Fullerene Nano-Particles on Lipid Membrane. PLoS ONE, 2013, V. 8: e77436.
19. Gupta R., Rai B. Molecular Dynamics Simulation Study of Translocation of Fullerene C_{60} through Skin Bilayer: Effect of Concentration over Barrier Properties. Nanoscale, 2017, V. 9, P. 4114-4127.
20. Barnoud J., Rossi G., Monticelli L. Lipid membranes as solvents for carbon nanoparticles. Phys. Rev. Lett., 2014, V. 112: 068102.
21. Xie L., Liu Y., Xi Z., Li H., Liang S., Zhu K. Computer simulations of the interaction of fullerene clusters with lipid membranes. Mol. Simul. 2017, V. 43, P. 1532-1538.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. За використання оригінальної ультразвукової технології, СЕМ, СТМ і АСМ мікроскопії високої роздільної здатності та спектроскопічного методу ДРС приготовлено та охарактеризовано водний колоїдний розчин C_{60} фулеренів (C_{60}ВРФ) концентрації 0,15 мг/мл, необхідної для проведення його подальшого біотестування. Показано, що C_{60}ВРФ містить як поодинокі молекули C_{60}, так і їх сферичні агрегати розміром 1,2-120 нм (при цьому значна частина (~35%) припадає на наночастинки діаметром 50 нм). Значення дзета-потенціалу для C_{60}ВРФ складало -27,0 мВ, що свідчить про його високу стабільність.

2. Здійснено літературний пошук та відібрано активні протеїни-мішені у складі коронавірусу SARS-CoV-2 (RdRp і 3CLpro) та чутливих до них клітин різних органів (ACE2), здатних зв'язуватися із C_{60} фулереном. Так, для RdRp і 3CLpro протеїнів ідентифіковано чотири сайти зв'язування: три (1. кишеня розміщена у каналі синтезу РНК; 2/3. різні частини інтерфейсу зв'язуванн RdRp-Nsp8) та одна (кишеня розміщена біля каталітичної діади (Cys145 та His41) на стику структурних доменів 3CLpro), відповідно. Здійснено дизайн потенційних комплексу «C_{60}-3CLpro» в імітованому клітинному середовищі за використання методів МД і молекулярного докінгу. Показано, що C_{60} фулерен може утворювати стабільний комплекс з білком 3CLpro коронавірусу SARS-CoV-2 і, таким чином, пригнічувати його функціональну активність.

3. Здійснено дизайн потенційних комплексів «C_{60}-протеїн коронавірусу SARS-CoV-2» в імітованому клітинному середовищі за використання методів МД і молекулярного докінгу. Відповідно до результатів молекулярного докінгу C_{60} фулерен повністю заповнює відібрані три потенційних сайти зв'язування протеїну RdRp і, більш того, є затиснутим там різноманітними стекінг та стеричними взаємодіями. За результатами МД ключові взаємодії з протеїном RdRp зберігаються для усіх сайтів зв'язування. Для протеїнів 3CLpro і RdRp оцінили значення енергії зв'язування із C_{60} фулереном за використання методів MMPBSA та MMGBSA. Здійснено дизайн потенційних нанокластерів C_{60} фулерену у

водному середовищі та проаналізовано їх здатність таргетувати протеїни RdRp та 3Clpro і, таким чином, пригнічувати функціональну активність коронавірусу SARS-CoV-2.

4. Детально проаналізована структура рецепторного білка ACE2 щодо його можливих механізмів зв'язування із C_{60} фулереном. Зокрема, виявлено три потенційних сайти зв'язування між жолобком PD білка ACE2 і C_{60} фулереном, які характеризуються присутністю у своїй структурі амінокислот, здатних утворювати міцні стекінг або катіон-π взаємодії з окремим C_{60} фулереном або з таким у складі нанокластера. Здійснено дизайн потенційних комплексів «C_{60}-ACE2» в імітованому клітинному середовищі за використання методів МД і молекулярного докінгу. Доведено, що C_{60} фулерен здатний утворювати стабільні комплекси з ACE2 протеїном, а відтак - пригнічувати його функціональну активність, що важливо для блокування взаємодії ACE2 із S-протеїном SARS-CoV-2. Оцінено здатність C_{60} фулерену/його нанокластера проникати через ліпідну мембрану. Відповідно до результатів МД передбачається, що C_{60} фулерени у складі нанокластерів здатні утворювати пори в оболонці коронавірусу SARS-CoV-2, руйнуючи таким чином цілісність його структури, що веде до порушення мембранозалежних стадій циклу реплікації цього вірусу.

Підсумовуючи, біобезпечні водорозчинні немодифіковані C_{60} фулерени можна розглядати як потенційні профілактичні та терапевтичні наноагенти проти найбільш поширених коронавірусів, які несуть загрозу життю людини і тварин, що потребує подальших до/клінічних тестувань.

Результати виконаних досліджень були представлені на 9-тій Міжнародній конференції «Нанотехнології та наноматеріали» НАНО-2021 (25-27 серпня 2021 року, м. Львів) (http://nano-conference.iop.kiev.ua/) та 13th EBSA congress (July 24–28, 2021, Vienna, Austria) (https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00249-021-01558-w.pdf).

За результатами виконаних досліджень опубліковано такі праці:

Розділ монографії

V. Hurmach, M. Platonov, S. Prylutska, Z. Klestova, V. Cherepanov, **Yu. Prylutskyy**, U. Ritter. ***Chapter 10.*** Anticoronavirus activity of water-soluble pristine C_{60} fullerenes: *in vitro* and *in silico* screenings. In "**Coronavirus Therapeutics – Volume I**" (Editors: A.A.A. Asea, P. Kaur**)**, Springer International Publishing, 2022. DOI: 10.1007/978-3-030-85109-5 (особистий внесок авторів проєкту полягає у постановці завдань дослідження, приготуванні (разом з німецькими колегами згідно ТЗ проєкту) і характеризуванні зразків, проведенні *in vitro* та *in silico* досліджень).

Стаття у фаховому виданні

V.V. Hurmach, M.O. Platonov, S.V. Prylutska, P. Scharff, **Yu.I. Prylutskyy**, U. Ritter. C_{60} fullerene against SARS-CoV-2 coronavirus: an *in silico* insight. **Sci. Reports**, 2021, V. 11: 17748. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-021-97268-6 (**IF 4.379; Q1**) (особистий внесок авторів проєкту полягає у постановці завдань дослідження, проведенні *in silico* досліджень)

Патент

З.С. Клестова, С.В. Прилуцька, А.К. Вороніна, Ю.І. Прилуцький. Патент України на винахід «Спосіб зниження інфекційної активності коронавірусів різних груп шляхом використання водного розчину C_{60} фулерену». **№ a202105631 від 06.10.2021** (особистий внесок авторів проєкту полягає у постановці завдань дослідження, характеризуванні зразків та проведенні *in vitro* досліджень)