Форма № Н-9.02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

ННІ «Фізико-технічний факультет»

Кафедра медичної фізики та біомедичних нанотехнологій

Пояснювальна записка

До дипломної роботи магістра

на тему (укр. мова) Комп'ютерне моделювання біомолекулярних взаємодій противірусних агентів

на тему (англ. мова) Computer modeling of biomolecular interactions of antiviral drugs

Виконав: студент 2 курсу, групи ТЛ-61

Напрям підготовки 105 «Прикладна фізика та наноматеріали»

Михайло ЩУКА

(підпис, прізвище та ініціали)

Керівник: Валерія ТРУСОВА

(підпис, прізвище та ініціали)

Рецензент: Володимир ФАРАФОНОВ

(підпис, прізвище та ініціали)

Харків – 2023 року

АНОТАЦІЯ

Щука М.М. – Комп’ютерне моделювання біомолекулярних взаємодій противірусних агентів. – Рукопис.

Дипломна робота магістра за спеціальністю 105 «Прикладна фізика та наноматеріали» – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, 2023.

156 с., 54 рис., 12 табл., 158 джерел.

«Найбільшою загрозою для подальшого домінування людини на планеті є вірус» — Джошуа Ледерберг, доктор філософії, лауреат Нобелівської премії.

Незважаючи на численні дослідження SARS-CoV-2, наразі вірус ще створює значну загрозу людству. Для лікування використовуються різні препарати широкої противірусної дії та їх комбінації, щоб досягти лікувального ефекту. Використовуються як низькомолекулярні противірусні агенти (як-от спермідин) та макромолекулярні (інтерферон-альфа-2b). Проте достовірно не відомі наслідки молекулярних взаємодій цих ліків: покращення лікувального ефекту, його зниження або відсутність впливу.

Щоб відповісти на ці запитання, а саме пошук механізмів взаємодії цих противірусних агентів та наслідків, потрібно скомбінувати різні методи дослідження на модельних системах та провести експериментальні дослідження для вичерпної відповіді.

Метою цієї роботи було встановлення особливостей взаємодії низькомолекулярних противірусних препаратів з агентами білкової природи *in silico*, що надають базу для проведення досліджень *in vitro* задля розробки кращих терапевтичних стратегій.

У проведеному дослідженні були використані низькомолекулярні лікарські засоби спермідин, нітазоксанід і білкові лізоцим, лактоферин та інтерферон-альфа-2b. Методами молекулярного докінгу проаналізовано сайти зв’язування на макромолекулах та оцінено біологічні ефекти таких взаємодій.

Результати *in silico* вказують на те, що кожна комбінація ліганд-білок потенційно може вплинути на функції кожного агенту через наявність

широкого спектру взаємодій та міцних зав’язків. Використані ліки потребують подальших досліджень *in vitro* для розробки ефективних методів лікування.

ABSTRACT

Shchuka M.M. - Computer modeling of biomolecular interactions of antiviral drugs. - Manuscript.

Master's project in specialty 105 "Applied Physics and Nanomaterials" - V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2023.

156 p., 54 figures, 12 tables, 158 sources.

«The single biggest threat to man's continued dominance on the planet is the virus» – Joshua Lederberg, Ph.D., Nobel laureate.

Despite numerous studies of SARS-CoV-2, the virus still poses a significant threat to humanity. For treatment, various broad-spectrum antiviral drugs and their combinations are used to achieve a therapeutic effect. Both small-molecule antiviral agents (such as spermidine) and macromolecular agents (interferon-alpha-2b) are used. However, the consequences of molecular interactions of these drugs are not known for certain: improvement of the therapeutic effect, its reduction or absence of influence.

To answer these questions, namely, to find the mechanisms of interaction of these antiviral agents and the consequences, it is necessary to combine various research methods on model systems and conduct experimental studies to provide an exhaustive answer.

The aim of this work was to establish the peculiarities of interaction of small molecule antiviral agents with protein-based agents *in silico*, which provide a basis for in vitro studies to develop better therapeutic strategies.

In this study, we used the small molecule drugs spermidine, nitazoxanide and the protein lysozyme, lactoferrin and interferon-alpha-2b. The binding sites on the macromolecules were analyzed by molecular docking methods and the biological effects of such interactions were evaluated.

The *in silico* results indicate that each ligand-protein combination has the potential to affect the function of each agent due to the presence of a wide range of interactions and strong binding sites. The drugs used require further in vitro studies to develop effective treatments.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 7
ВСТУП 8
РОЗДІЛ 1 ПРОТИВІРУСНІ АГЕНТИ. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 11
1.1 Лізоцим 11
1.2 Лактоферин 15
1.3 Інтерферон 24
1.4 Спермідін 30
1.5 Нітазоксанід 34
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1 39
РОЗДІЛ 2 КОМП'ЮТЕРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ 41
2.1 Лізоцим та нітазоксанід 43
2.1.1 SwissDock 43
2.1.2 PatchDock 50
2.1.3 Висновки 55
2.2 Лізоцим та спермідин 59
2.2.1 SwissDock 59
2.2.2 PatchDock 65
2.2.3 Висновки 70
2.3 Лактоферин та нітазоксанід 74
2.3.1 SwissDock 74
2.3.2 PatchDock 81
2.3.3 Висновки 88
2.4 Лактоферин та спермідин 93
2.4.1 SwissDock 93
2.4.2 PatchDock 99
2.4.3 Висновки 104
2.5 Інтерферон та нітазоксанід 107
2.5.1 SwissDock 107
2.5.2 PatchDock 113

2.5.3 Висновки 117
2.6 Інтерферон та спермідин 121
2.6.1 SwissDock 121
2.6.2 PatchDock 127
2.6.3 Висновки 132
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 2 135
ВИСНОВКИ 138
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 140

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

IFN – інтерферон

IFN-α/β – інтерферони I типу

LF – лактоферин

ISG – гени, стимульовані інтерфероном

NK-клітини – природні кілери

NTZ – нітазоксанід

TIZ – тізоксанід

DS – програма BIOVIA Discovery Studio

PLIP – сервіс Protein-Ligand Interaction Profiler

ВСТУП

Не існує встановленого ефективного лікування COVID-19, і деякі з досліджуваних варіантів лікування навряд чи стануть широко доступними найближчим часом, особливо в умовах недостатності ресурсів. Потрібен безпечний антимікробний препарат, який може діяти при пероральному прийомі, щоб зменшити ризик зараження або запобігти прогресуванню легких випадків до важких випадків. За відсутності затвердженого противірусного препарату проти SARS-CoV-2 сьогодні оцінюється ряд противірусних препаратів на їх терапевтичну ефективність [1, 2].

Рівні лактоферину і лізоциму в сльозах зменшують ризик зараження інфекціями верхніх дихальних шляхів, і ці протимікробні засоби широко поширені в природі. Лактоферин зв'язує вільне залізо і пригнічує реплікацію нового коронавірусу.

Лактоферин, інтерферони I типу (IFN-α/β) та лізоцим є поширеними безпечними протимікробними препаратами, які мають широкий спектр противірусних, а також імуномодулюючих властивостей. І лактоферин, і лізоцим є «імунно-чутливими», оскільки вони можуть стимулювати імунні реакції або усунути запалення.

Нещодавно повідомлялося, що лактоферин і лізоцим є важливими біомаркерами імунної компетентності слизової оболонки: їх рівні передбачають ризик інфекцій верхніх дихальних шляхів [3]. Концентрації лактоферину і лізоциму знижуються з віком [4], потенційно підвищуючи ризик респіраторних інфекцій. Лактоферин і лізоцим є одними з найпоширеніших протимікробних препаратів в природі, які широко поширені в тканинах тварин і виділеннях [5] і вважаються одними з найбільш перспективних протимікробних препаратів для клінічного застосування [6]. Обидва вони діють проти бактерій, вірусів і грибків, а також позитивно впливають на імунну систему, але при цьому послаблюють патологічні ефекти надмірної реакції імунної системи. Лактоферин і лізоцим мають високі концентрації в сльозах, порівняно з будь-якою іншою рідиною

організму, а лактоферин в однаково високих концентраціях міститься в грудному молозиві - це свідчить про важливу роль цих білків в захисті організму [7].

Інтерферони I типу (IFN-α/β) мають широкий спектр противірусної активності проти РНК-вірусів, які діють викликаючи противірусну відповідь у широкого діапазону типів клітин та опосередковуючи адаптивну імунну відповідь. Люди виробляють 13 видів IFN-α і один IFN-β [8]. INF I типу в кінцевому підсумку стимулюють ряд генів, які кодують різні противірусні ефектори [9]. IFN-α є найбільш ефективним інтерфероном для лікування.

Спермідин – це поліамін, що бере участь у клітинному метаболізмі. Він виявлений у всіх еукаріотичних клітинах. Попередником синтезу є амінокислота орнітин. Він також є важливим фактором росту деяких бактерій. Спермідин пов’язаний з нуклеїновими кислотами і, як вважають, стабілізує спіральну структуру, особливо у вірусах.

Нітазоксанід є протипаразитарним та противірусним препаратом широкого спектру дії, який використовується в медицині для лікування різних глистяних, протозойних та вірусних інфекцій. Також нітазоксанід має протипаразитарну активність *in vitro* та клінічну ефективність в лікуванні інфекцій, викликаних іншими найпростішими та гельмінтами; а також має ефективність при лікуванні низки вірусних інфекцій.

Лактоферин, лізоцим, інтерферон-α, спермідин та нітазоксанід - речовини, які окремо продемонстрували значний потенціал як противірусні агенти для протидії пандемії SARS-CoV-2. Проте невідомі наслідки взаємодії цих противірусних агентів у комплексах ліганд-білок. Актуальність роботи полягає у тому, що дослідження цих ефектів *in silico* допоможе якісно спроектувати моделі експериментів *in vitro* задля покращення терапевтичних стратегій.

Метою роботи було проведення молекулярного докінгу комплексів ліганд-білок та дослідження сайтів зв’язування на предмет амінокислотного складу, типів взаємодій та потенційних біологічних наслідків.

Для досягнення поставленої мети були сформовані та виконані наступні завдання:

1. Побудова молекул низькомолекулярних препаратів нітазоксаніду та спермідину (у програмі MarvinSketch), оптимізація геометрії (у Avogadro) та редагування зарядів за допомогою R.E.D. Server.
2. Виконання гомологічного моделювання інтерферону-альфа-2b за допомогою SWISS-MODEL. Підготовка макромолекул до проведення моделювання стикування.
3. Проведення молекулярного докінгу у SwissDock та PatchDock.
4. Дослідження електростатичного потенціалу сайтів звязування.
5. Порівняльний аналіз результатів молекулярного докінгу за допомогою програм Discovery Studio та PLIP. Візуалізація молекулярних комплексів у програмному забезпеченні UCSFChimera.

РОЗДІЛ 1 ПРОТИВІРУСНІ АГЕНТИ. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Лізоцим

Лізоцим є найстарішим універсальним ферментом білкової природи, єдиним поліпептидним ланцюгом, що складається з 127-130 амінокислотних залишків з молекулярною масою 14,3 кДа. Цей фермент є важливим білком. Його багатим джерелом є курячий яєчний білок (3,8 г/л) [10]. Він може бути отриманий в промислових масштабах як біологічно активний препарат. Лізоцим відомий як гідролаза, яка розрізає глікозидний зв'язок β-1-4, але його димерна форма має інші дуже цінні властивості. Яєчний лізоцим має корисні властивості як харчовий консервант і вважається безпечною харчовою добавкою.

Лізоцим, також відомий як мурамідаза або N-ацетилмурамід-глікангідролаза, є консервативним антимікробним білком, що виробляється тваринами та є частиною вродженого імунітету (рис. 1).

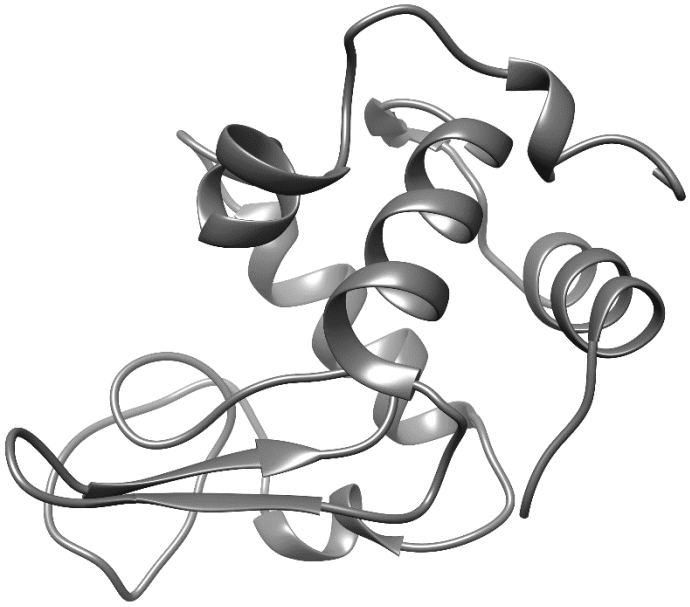


Рисунок 1.1 Структура лізоциму

Молекула складається з двох областей, з'єднаних довгою α спіраллю, між якими розташований активний центр ферменту [11]. N-кінцевий домен (залишки 40-88) складається з декількох спіралей і в основному є антипаралельним β-листом. Другий домен складається з залишків 1-39 і 89-

129, а його вторинна структура в значній мірі складається з α-спіралей. Дві області молекули розділені спіраль-циклом ASP:87-ARG:114, який відіграє ключову роль у його антимікробній функції. Молекула відповідає принципу гідрофобності всередині і гідрофільності зовні: всі полярні групи знаходяться на поверхні, а більшість гідрофобних груп приховані всередині ферменту. Конформаційний перехід в лізоцимі передбачає відносний рух двох його частин один до одного, що забезпечує вільний доступ до субстрату і створює відповідне середовище для каталізу. Вважається, що такий тип конструкції відіграє вирішальну роль у ферментативній дії лізоциму [12].

Завдяки високому значенню ізоелектричної точки фермент зв’язується з овумоуцином яєчного білка (pI 4.5-5.0) і негативно зарядженими залишками сіалової кислоти в глікопротеїні, а також з овотрансферином (pI 6.0) і овальбуміном (pI 6.0). Лізоцим є дуже стабільним ферментом. Чотири дисульфідні зв’язки одного поліпептидного ланцюга роблять цю маленьку білкову молекулу надзвичайно компактною і дуже стабільною. Повинні бути збережені принаймні два -S-S- зв’язки для підтримки ферментативної функції. Два з чотирьох дисульфідних зв’язків також відповідають за термічну стійкість ферменту, його активність зберігається навіть через 1-2 хвилини при 100 °C. Така ж висока стабільність спостерігається в кислому розчині з pH 3.0-4.0. Однак сполуки тіолу швидко інактивують лізоцим, а тому активність ферменту в білку курячих яєць відсутня при нагріванні до 60 °C через наявність вільних SH-груп овалбуміну при такій температурі [13].

Лізоцим існує в двох конформаціях, від 20 до 30 °C з перехідною точкою при 25 °C [14]. У природі фермент є оборотним димером в діапазоні pH від 5.0 до 9.0. Також відомо, що лізоцим білка курячого яйця має тенденцію зв’язуватися в незворотню димерну форму (імовірно, через міжмолекулярний дисульфідний обмін) при тривалому зберіганні яєць. Димер зберігає ферментативну активність мономера, а це означає, що реакція не призводить до втрати гідролітичної активності. Димеризація, як і будь-який більш високий процес полімеризації, залежить від pH, концентрації

ферментів і температури. Модифікований лізоцим демонструє абсолютно нові властивості і нову антимікробну активність.

Показано, що димер лізоциму стимулює синтез деяких інтерлейкінів і інтерферонів α і γ. Він також модулює утворення альфа-фактору некрозу пухлин, запобігаючи негативним ефектам через їх надлишкові рівні. Димер індукує активність фагоцитарних клітин і в той же час запобігає надмірному утворенню вільних радикалів. Він також проявляє значну противірусну активність проти декількох вірусних штамів, а його антибактеріальні властивості схожі з деякими антибіотиками.

Лізоцим вбиває грампозитивні бактерії шляхом гідролізу β-1-4 глікозидного зв'язку між N-ацетилглюкозаміном і N-ацетилмурамовою кислотою в бактеріальній клітинній стінці [5]. Розкладання бактерій лізоцимом має два наслідки: 1) руйнування бактерій і 2) виділення імуномодулюючих бактеріальних лігандів, включаючи фрагменти пептидогліканів [5]. Однак, крім ферментативної активності, він має антимікробну дію завдяки своїй катіонній природі, що дозволяє йому зв'язуватися з негативно зарядженими поверхнями (як у випадку з лактоферином), тим самим розширюючи свою активність далеко за межі грампозитивних бактерій [5, 15]. На додаток до їх ферментативної активності, лізоцими с-типу (такі як лізоцим людини і миші LysM і LysP) є катіонними [16] і можуть проникати в негативно заряджені бактеріальні мембрани утворюючи пори [17].

Лише нещодавно була оцінена імуномодулююча функція лізоциму [5]. Хоча лізоцим, впливаючи на мікроби всередині нейтрофілів і макрофагів, підсилює їх прозапальну реакцію, при позааклітинному вивільненню цими клітинами (а також епітеліальними клітинами) він обмежує запалення: зменшує окислювальний вибух і хемотаксис у нейтрофілів [18] значно пригнічує продукти альфа-факторів некрозу пухлин і IL-6 макрофагів [19], зв'язує і знижує рівні циркулюючих AGE (розширені кінцеві продукти глікації, які є прооксидантами), а також підсилює їх виведення нирками.

Екзогенний лізоцим погіршує здатність пептидоглікану зв'язувати фактори комплементу, які діють як анафілотоксини [5]. Примітно, що, як і у випадку з лактоферином, лізоцим має нейропротекторну функцію при хворобі Альцгеймера, запобігаючи агрегації бета-амілоїду [20], що може мати наслідки при неврологічних проявах за важкого перебігу COVID-19. Автори [21] продемонстрували, що ко-рецептура ніклозаміду з ендогенним лізоцимом людини може забезпечити пряму аерозольну доставку препарату в дихальні шляхи як альтернативу пероральній доставці, тим самим ефективно лікуючи COVID-19.

З моделей мишей і свиней видно, що лізоцим відіграє важливу роль в системному обмеженні запалення, що призводить до зниження імунологічної патології [5]. Клінічні випробування лізоциму на людях обмежені [22], але в основному при пероральному застосуванні показали противірусну дію проти герпесу (у дозі 1 г/добу [23]), корі [22] і гепатиту – 170 мг/добу лізоцим хлориду протягом 4-24 тижнів значно знижував захворюваність посттрансфузійним гепатитом до 8% порівняно з 20% [24], успішне лікування інфекцій ясен (750 мг/добу [25]) і виразки шкіри [22], поліпшення імунних реакцій у онкохворих з імуносупресією [25]. Лізоцим людини в поєднанні з лактоферином (0.2 г лізоциму і 1.5 г лактоферину на добу) знижує дисфункцію кишечника у малавійських дітей [26]. У цих дослідженнях на людях не повідомлялося про місцеві або системні побічні ефекти. Що стосується вивчення лізоциму при захворюваннях легень, то в Східній Європі він успішно застосовується в поєднанні з антибіотиками для лікування бронхіту і пневмонії у людей без респіраторної або системної токсичності [27]. Застосування лізоциму як аерозолів для лікування пневмонії досліджено на тваринних моделях [28, 29]. Застосування 1% розчину аерозольного лізоциму людини у хом'яків з пневмонією призвела до зниження гістопатологічних змін в легенях, апоптозу альвеолярної перегородки, нейтрофілів та інших лейкоцитів в рідині бронхоальвеолярного лаважу, а також до підвищення активності лізоциму в цій рідині [29]. Однак

слід зазначити, що лізоцим погіршує здатність гіалуронової кислоти запобігати пошкодженню еластази шляхом зв'язування лізоциму з еластичними волокнам [30].

Додавання екзогенного лізоциму має ряд інших імуносупресивних ефектів. Знижує хемотаксис і окислювальний вибуху в нейтрофілах. Лізоцим може безпосередньо зв'язувати і нейтралізувати позаклітинні прооксидантні похідні (кінцеві продукти глікації) [31]. Ця взаємодія також блокує ферментативну бактерицидну активність лізоциму, що може мати вторинний вплив на імунну відповідь при інфекції [31].

Хоча лізоцим важливий для запуску прозапальних реакцій, він також відіграє роль у системному обмеженні запалення, що призводить до зниження запальної патології [32].

3 види лізоцимів були описані на основі їх амінокислотної послідовності і біохімічних властивостей: курячий або нормальний тип (c-тип), гусячий тип (g-тип) і тип безхребетних (i-тип). Лізоцими C-типу переважно присутні в хордових і в різних класах членистоногих. Лізоцими G-типу зустрічаються в хордових і у деяких молюсків.

Лізоцим здатний інактивувати ізоантигени - всі види пухлин. Їх інактивація відбувається шляхом розщеплення полісахаридного ланцюга мембран мурамінових клітин, включаючи цитолему [33]. Зниження рівня лізоциму, який здатний інактивувати ізоантигени, сприяє розвитку пухлинного процесу.

1.2 Лактоферин

Лактоферин (LF) - це залізозв'язуючий глікопротеїн з молекулярною масою близько 76 кДа, вперше ізольований і очищений з молока [34]. Цей білок висококонсервативний у різних видів [35]. Завдяки своїй структурній схожості з трансферином і його здатності зв'язувати іони Fe3+, LF був класифікований як член сімейства трансферинів [36, 37]. Він складається з двох гомологічних областей, званих N- і C-долями (рис. 1.2).

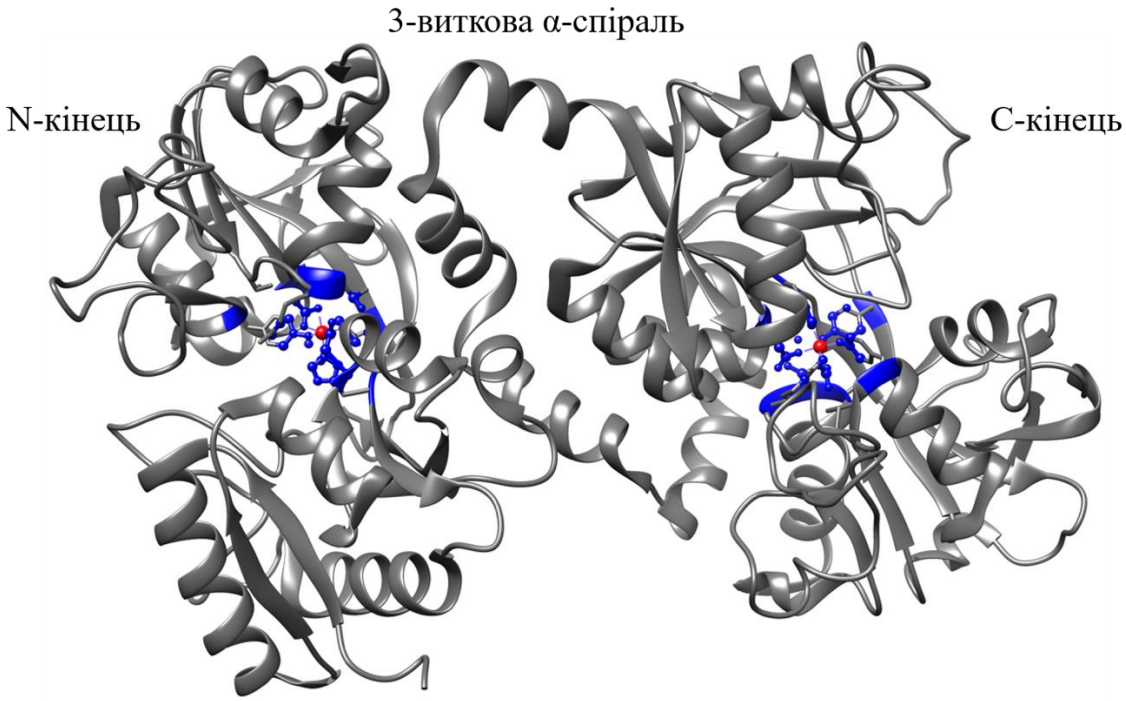


Рисунок 1.2 Тривимірна структура лактоферину людини (1B0L, Protein Data Bank). Білок представлений у вигляді стрічки, а тривалентні іони заліза представлені у вигляді сфер ван дер Ваальса.

LF людини - катіонний глікозольований білок, що складається з 691 амінокислоти [38]. Ланцюг складається в дві еліпсоїдальні частини, звані долями N і C, з'єднаними спіральним пептидним ланцюгом. Кожна частка також ділиться на два домени: N1 і N2 в N-долі та C1 і C2 в C-долі. У кожній частині є сайт зв'язування заліза, де іон металу координується чотирма бічними ланцюгами амінокислот: карбоксилатом з одного залишку аспарагінової кислоти, два атоми фенолату кисню з двох залишків тирозину і один імідазол з одного залишку гістидину. Іон металу стабілізується в місці зв'язування з білком за рахунок двох атомів кисню іона карбонату (рис. 1.3) [39].

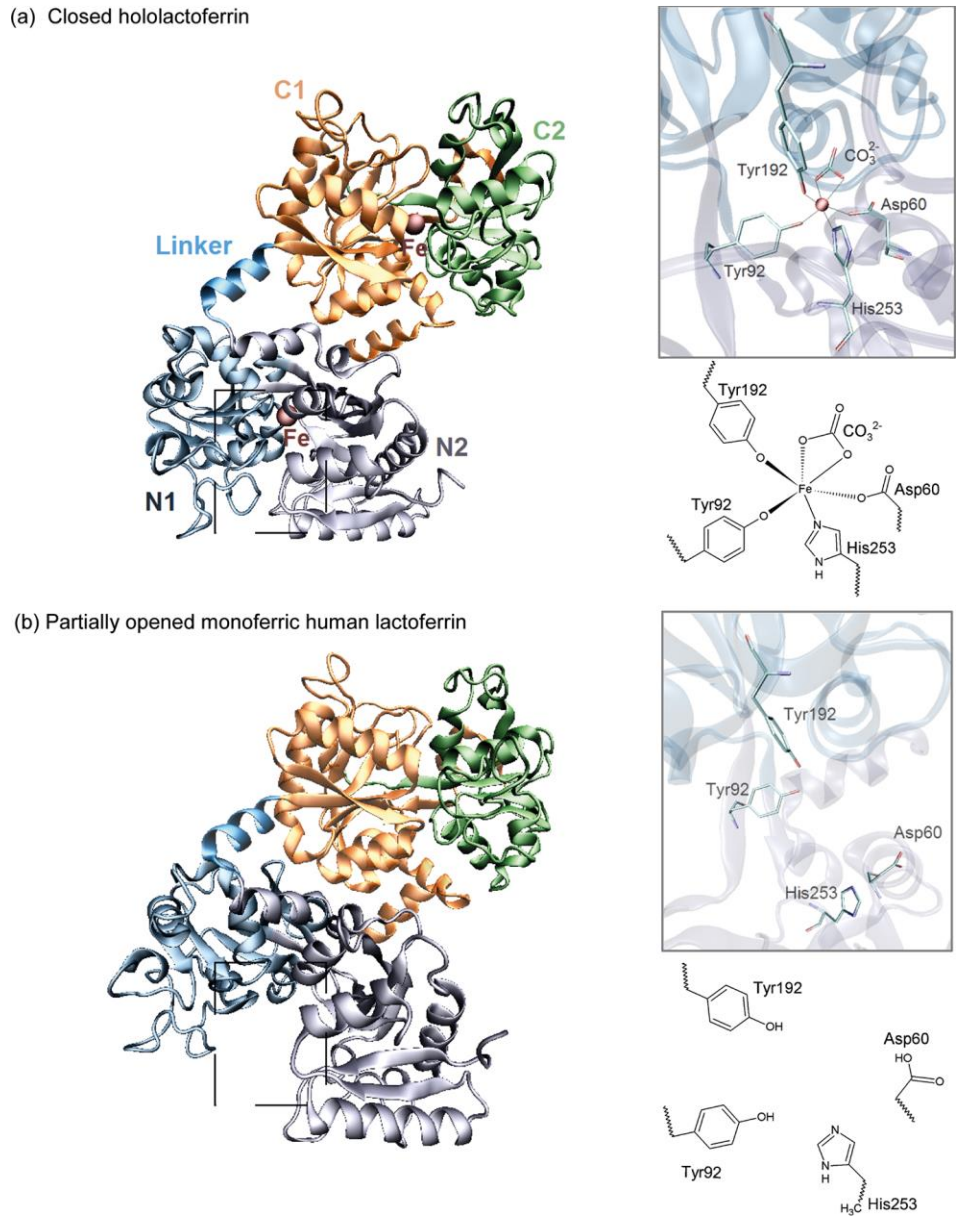


Рисунок 1.3 Зображення загальної структури хололактоферину людини (а) (1B0L) і (б) монозалізного лактоферину людини (1LFH), іони тривалентного заліза представлені у вигляді сфер. Крупним планом зображено координаційний центр іонного металу в N-частці лактоферину людини в закритому (а) і відкритому вигляді (б) з залишками Asp60, Tyr92, Tyr192, His253 [35].

Бичачій LF містить 689 амінокислот [40]. LF і трансферин мають схожий амінокислотний склад, вторинні структури (включаючи їх дисульфідні зв’язки) і третинні структури, хоча і відрізняються біологічною функцією [41, 42]. Існує також три різних ізоформи: LF-a зв’язує залізо, в той

час як LF-b і LF-g мають активність рибонуклеази, але не зв'язують залізо [41]. Коли LF зв'язав залізо, його називають хололактоферином, а коли він не містить заліза, його називають аполактоферином. Третинні структури двох форм істотно відрізняються: аполактоферин характеризується відкритою конформацією N-частки і замкнутою конформацією С-частки, в той час як в хололактоферині обидві частки закриті [43]. LF людини і бика мають високо гомологічну амінокислотну послідовність. На сьогоднішній день кілька досліджень підтвердили, що LF має протизапальну, імуномодулюючу, противірусну, антибактеріальну і антиоксидантну активність [44, 45]. Тому прийнято давати бичачу форму як добавку, а не рекомбінантну людської форму.

Одна молекула LF може зв'язувати два іони Fe^{3+} разом з двома іонами CO_3^{2-} [46]. Одним з основних напрямків дії LF є його вплив на гомеостаз заліза. LF шляхом зв'язування з залізом збільшує його всмоктування в кишечнику і, таким чином, може збільшити гемоглобін і загальний рівень заліза в сироватці крові. Однак важливою властивістю є те, що LF не виділяє залізо навіть при pH 3.5, що важливо, тому що ця властивість забезпечує секвестр заліза в інфікованих тканинах, де pH зазвичай кислий [47].

Катіонність LF дозволяє взаємодіяти з різними негативно зарядженими мікробними і вірусними поверхнями, ДНК, а також з клітинними поверхнями, що необхідно для адгезії бактерій і вірусів або для ранніх взаємодій, необхідних для проникнення вірусу [48].

LF також міститься в інших екзокринних рідинах, таких як слина, сльози і сперма. Крім того, він був виявлений на поверхні слизових оболонок і в гранулах деяких поліморфонуклеарних лейкоцитів, таких як нейтрофіли, дегрануляція яких була пов'язана з викидом LF в сироватку [49]. Концентрація LF в крові здорових людей становить від 0.02 до 2.00 мкг/мл і швидко збільшується до 200 мкг/мл при запаленні, інфекції, зростанні пухлини або перевантаженні залізом [50, 51].

Численні дослідження безпеки, алергенності і токсичності

застосування LF у тварин і людини показали, що його високі дози безпечні і добре переносяться [50, 52].

Численні функції LF залежать від його клітин-мішеней і від наявності на їх поверхні специфічних рецепторів. Насправді, існує багато рецепторів LF. Вони були виявлені в багатьох тканинах і типах клітин, включаючи епітеліальні клітини кишечника і лімфоцити [53, 54].

Важливо відзначити, що LF також зв'язується з гепаринсульфатними протеогліканами, які є макромолекулами поверхні клітини і позаклітинного матриксу, що складається з основного білка та ковалентно зв'язаними ланцюгами глікозаміногліканів [55]. Ці множинні рецептори можуть лежати в основі істотних і широко поширених ефектів, які може викликати LF, оскільки тільки при ураженні кількох цілей можуть бути серйозні наслідки.

Проникнення бактерій, бактеріальних продуктів або вірусів в клітину також може відбуватися через деякі з цих рецепторів. Таке зв'язування активує сигнальні системи і шляхи, в яких беруть участь різні регуляторні фактори інтерферону [56]. Під час інфекції активація цих сигнальних шляхів призводить до клітинної реакції, яка поділяє загальні цитоплазматичні компоненти, що в кінцевому підсумку призводить до активації складної біомолекулярної сигнальної мережі.

Лактоферин переходить зі шлунка через епітеліальні клітини в кров через ендоцитоз [57], особливо через бляшки Пейєра, або коли він інкапсульований в ліпосомах [58]. LF також може входити і реабсорбуватися з жовчі [57]. LF крові може додатково транспортуватися в ЦНС через спинномозкову рідину і через гематоенцефалічний бар'єр мозку [59].

Важливо також відзначити, що процес травлення ферментами в шлунково-кишковому тракті (пепсин, трипсин або хімотрипсин) виробляє фрагменти лактоферину, які все ще здатні зв'язувати залізо, і мають антимікробну активність, яка може бути сильнішою, ніж у неушкодженого білка [60].

Стабільність LF може залежати від широкого спектру чинників,

пов’язаних зі структурою білка (наприклад, насичення залізом), а також факторів навколишнього середовища, таких як pH, температура, іонна сила і наявність інших сполук (білків або полісахаридів) [34, 37]. Спосіб і терміни переробки, видобутку і зберігання також можуть істотно вплинути на активність LF. [37]. Зв’язування заліза LF змінює його молекулярну конформацію.

Було встановлено, що LF здатний підтримувати свою залізозв’язуючу здатність після нагрівання до температури від 65 до 90 °C і іонній силі близько 0.01 або нижче [61]. При підвищенні температури спостерігалися часткове випадіння осаду LF з помітним зниженням його залізозв’язуючої здатності.

LF може впливати як на вроджену, так і набуту імунну відповідь і модулювати гостре і хронічне запалення [62]. Більш того, експресія і секреція LF на поверхні слизових оболонок і його виділення в вогнищах запалення підтвердили його роль як засобу, який може бути корисним, наприклад, при вірусних і бактеріальних інфекціях.

Кілька досліджень *in vivo* та *in vitro* показали, що позитивний заряд LF дозволяє йому зв’язуватися з негативно зарядженими областями різних імунних клітин і різними патогенами, тим самим викликаючи сигнальні шляхи, які призводять до клітинних реакцій, таких як активація, диференціація і проліферацію [62].

Дані, отримані з *in vivo* та *in vitro* моделей показують, що LF здатний взаємодіяти з гранулоцитами, лімфоцитами, макрофагами і NK-клітинами (природними кілерами), тим самим посилюючи свої функції [63].

LF може сприяти дозріванню попередників Т-клітин в компетентні допоміжні клітини і може впливати на диференціацію незрілих В-клітин в ефективні антигенпрезентувальні клітини, обмежуючи проникнення вірусу в клітини під час інфекції.

LF здатний змінювати баланс клітинних субпопуляції Th1 і Th2 (цитокіни для клітинної імунної відповіді), тим самим обмежуючи надмірні

запальні реакції [64], і завдяки своїм властивостям зв’язування заліза також може допомогти зменшити виробництво активного кисню [65]. Слід зазначити, що таке різноманіття діяльності LF може сильно залежати від імунного статусу організму. Крім того, LF також може інгібувати нейтрофільні позаклітинні пастки, які захищають від напливу патогенів, але також можуть бути пов’язані з розвитком запальних та аутоімунних захворювань [66]. Було також показано, що він стимулює перехід прозапальних макрофагів (M1) до типу протизапальних макрофагів (M2). [67]. Аналогічно було показано, що пастеризоване цільне коров’яче молоко поляризує макрофаги від M1 до типу M2 [68].

Антибактеріальна активність LF була описана в дослідженнях *in vitro* та *in vivo* як на G+ так і G- бактеріях [62]. Слід зазначити, що LF може діяти через залізозалежні або залізонезалежні механізми. LF здатний зв’язувати або хелатувати залізо, яке пригнічує ріст бактерій [61]. Антибактеріальна активність LF спочатку вважалася пов’язаною з його спорідненістю до іонів Fe^{3+}, але нові дані свідчать про те, що не тільки апо-LF, який може зв’язувати залізо патогенів, але і холо-LF має здатність пригнічувати ріст деяких бактеріальних штамів.

Крім того, зв’язок LF з ліпополісахаридом підсилює дію інших антибактеріальних препаратів, таких як лізоцим, який проявляє високу ферментативну активність як проти G+, так і G- бактерій. Примітно, що LF не тільки здатний протидіяти штамам шкідливих бактерій, але також може стимулювати зростання корисних бактерій, таких як Lactobacilli spp., і тому потенційно може вважатися пробіотиком [69].

LF і його пептиди продемонстрували сильну протигрибкову і антикарциногенну активність [34]. Було продемонстровано, що LF може збільшити проникність грибкових мембран і, таким чином, здатний нейтралізувати грибкові клітини.

У декількох дослідженнях *in vitro* та *in vivo* було відзначено, що LF і його похідні виявляють протипухлинну дію через різні механізми, які

викликають апоптоз ракових клітин, наприклад, в легенях [70]. В останньому випадку було показано, що LF пригнічує активність циклінзалежних кіназ CDK2 та CDK4, і було висловлено припущення, що білок може викликати зупинку росту при переході клітинного циклу з G1 до S [71].

Сьогодні велика частина літератури з оцінки противірусної активності LF припускає, що цей білок захищає від проникнення вірусу в клітину, а не діє на подальшу реплікацію вірусу. LF має сильну противірусну активність проти широкого кола ДНК і РНК-вірусів [72, 73]. LF пригнічує проникнення вірусних частинок в клітини або шляхом безпосередньої взаємодії з вірусними частинками, або шляхом блокування їх клітинних рецепторів [73].

Було показано, що LF може запобігти інтерналізації деяких вірусів (наприклад, вірусу простого герпесу [74]) шляхом зв'язування з HSPG [75]. Лактоферин також може мати противірусну дію внутрішньоклітинно [76].

Добре відомо, що в умовах системного запалення окислювальний стрес опосередкує пошкодження клітин, що пов'язано з підвищеним вмістом вільного заліза [77]. Крім того, спостерігається порушення гомеостазу заліза і збільшення вільного заліза при бронхоальвеолярному лаважі гострого респіраторного дистрес-синдрому та інших легеневих патологіях [78]. Вільне залізо може вступати безпосередньо в реакцію з киснем, утворюючи супероксидні радикали або з перекисом водню (що виділяється нейтрофілами і макрофагами), щоб сформувати високотоксичний гідроксильний радикал [78]. Вільні радикали також можуть виділяти залізо з феритину, рівень якого підвищується у відповідь на зв'язування реактивного вільного заліза, а також у відповідь на гостру фазу і через витік, викликаний імунним пошкодженням, що призводить до подальшого утворення радикалів [79].

Ключовими ознаками COVID-19 є системне запалення при супутньому окислювальному стресі, дисрегуляції метаболізму заліза і коагуляції. Два перспективних дослідження SARS-CoV [80] і SARS-CoV-2 [81] *in vitro* показали, що LF пригнічує ранню фазу вірусної інфекції.

При зараженні COVID-19 LF може відігравати певну роль не тільки в

секвеструванні залізних і запальних молекул, кількість яких значно збільшується під час вивільнення цитокінів, але і, можливо, в сприянні захопленню рецепторів HSPG для запобігання зв'язування вірусів. Крім того, він може допомогти запобігти тромбоцитопенії та гіперкоагуляції, які є характерними ознаками інфекції COVID-19.

Зовсім недавно, Серрано та ін. [82] досліджували потенційну роль ліпосомального лактоферину (LLF) у 75 пацієнтів з типовими симптомами COVID-19, які дали позитивний результат на IgG/IgM. Автори показали, що LF ефективний у зменшенні деяких симптомів, наприклад, таких як сухий кашель, біль у м'язах або головний біль після 4-5 днів лікування, тоді як вплив на втрату смаку та нюху був незначним. Автори також припустили, що використання назальних крапель LF, спрею для рота також може бути корисним у лікуванні COVID-19.

Вхід у клітину SARS-CoV-2 дуже схожий на вхід SARS-CoV [83], і нещодавно було показано, що він чутливий до інгібування лактоферином [84]. Лактоферин пригнічував вхідні та вихідні стадії реплікації SARS-CoV-2, а також активність генів, стимульованих інтерфероном [84]. Крім того, було показано, що LF здатний запобігти розпізнаванню адгезії глікопротеїну рецептора ACE2, блокуючи проникнення вірусу в клітини [85].

Безсумнівно, LF може взаємодіяти з імунними клітинами і модулювати їх функції [34]. Крім прямої антимікробної дії, шляхом секвестру вільного заліза і відновлення гомеостазу заліза лактоферин знижує окислювальний стрес і запалення, характерні для патології COVID-19. Лактоферин протидіє дисрегуляції заліза шляхом зв'язування вільного заліза і відновлення рівнів різних білків (феропортин, церулоплазмін, рецептор трансферину 1 і феритин), які змінюються при запаленні [86]. Лактоферин знижує внутрішньоклітинні рівні реактивних видів кисню і знижує апоптоз, викликаний окислювальним стресом [87], а короткочасне пероральне застосування бичого лактоферину покращує антиоксидантні властивості [88]. Важливо відзначити, що лактоферин може «відчувати» статус імунної

активації і реагувати відповідним чином [89].

Крім того, пептиди, отримані з лактоферину, пригнічують прозапальні дії ангіотензину II шляхом зв'язування з рецептором ангіотензину II типу 1 [90], а лактоферин, як і інші пептиди коров'ячого молока, має антитромботичну дію [91]. Ці ефекти протидії дисрегуляції заліза, окислювального стресу, запалення, викликаного нейтрофілами і макрофагами, запалення, викликаного ренін-ангіотензинованою системою, і тромбозу, мають велике значення для COVID-19. Крім того, лактоферин демонструє потенціал застосування при хворобі Альцгеймера, зменшуючи агрегацію бета-амілоїдів (що призводить до запалення і дегенерації нейронів) [67].

У тваринних моделях сепсису одна пероральна доза лактоферину захищає від прогресування системних запальних реакцій, спричинених інсультом [87], а при пероральному застосуванні після ураження легень, спричиненого сепсисом, лактоферин був ефективним терапевтичним засобом [92]. Крім того, було показано позитивний вплив лактоферину на патологію легень: пероральні дози лактоферину людини або миші знижують патологію, викликану мікобактеріями туберкульозу в мишачій моделі [93], аерозольний бичачий лактоферин, що вводиться в мишачій моделі муковісцидозу з інфекцією легень pseudomonas aeruginosa, призвів до зниження бактеріального навантаження, зменшення інфільтрованих білих кров'яних клітин і зниження перевантаження залізом [86].

Тривале пероральне споживання продуктів, що містять лактоферин великої рогатої худоби, включаючи йогурт і молоко (від 100 до 500 мг лактоферину в день), або знижує захворюваність, або полегшує симптоми поширених вірусних інфекцій, таких як норовірус [94].

1.3 Інтерферон

Позаклітинні сигнальні молекули, відомі як цитокіни, активують каскад внутрішньоклітинних шляхів, які регулюють ріст та диференціацію і викликають противірусні та імунологічні реакції. Цитокіни включають

інтерферони, інтерлейкіни (IL), фактори росту пептидів, колоніестимулюючі фактори, фактори пригнічення росту та диференціації [95].

Інтерферони – це цитокіни, що виробляються і виділяються практично всіма еукаріотичними клітинами у відповідь на певні віруси, бактерії, антигени і мітогени; вони опосередковують свою біологічну активність, зв'язуючись зі специфічними рецепторами на поверхні клітини [96, 97]. Ці білки мають терапевтичний потенціал для широкого спектру інфекційних і проліферацийних захворювань через їх плейотропний вплив на численні метаболічні, імунологічні та патологічні процеси [98]. Рекомбінантні альфа-інтерферони (IFN-α) були вперше схвалені для лікування волохатоклітинного лейкозу Управлінням з контролю за продуктами і ліками США (FDA) більше десяти років тому [98]. З тих пір різні форми рекомбінантних інтерферонів отримали схвалення регулюючих органів у більш ніж 86 країнах для лікування багатьох захворювань, включаючи хронічний гепатит С, злоякісну меланому, неходжкінську лімфому і хронічний мієлоїдний лейкоз [99].

Інтерферони I типу складаються з групи щонайменше 13 структурно пов'язаних підтипів INF-α з подібною біологічною активністю. Кожен підтип має унікальний профіль активності; в даний час у клінічній підготовці використовуються тільки підтипи INF-α-2a, INF-α-2b (період напіввиведення обох препаратів у сироватці крові становить менше 12 годин [100, 101]) і природній IFN-α [102].

INF-α/β I типу є противірусними препаратами широкого спектру дії, які мають як пряму інгібіторну дію на вірусну реплікацію, так і підтримують імунну відповідь на чисту вірусну інфекцію [103].

IFN-α індукує багато потужних білків, які регулюють вірусний і клітинний ріст [104]. Крім того, IFN-α активізує ключові компоненти клітинної імунної системи, які важливі для розпізнавання вірусу [105].

Інтерферони були вперше виведені в 1957 році як противірусні молекули. Залежно від типу рецептора на поверхні клітинної мембрани інтерферони поділяються на тип I і тип II. Тип I складається з INF-α, INF-β,

INF-ω і INF-τ, а тип II складається з INF-γ. INF I типу - сімейство цитокінів, в якому подібність амінокислотної послідовності досягає 30-80% [106]. Однак невеликі структурні відмінності в цих білках можуть бути причиною значно різних біологічних дій [107]. Гени, що кодують IFN, розташовані на хромосомі 9 людини [108].

IFN I типу в кінцевому підсумку індукують ряд генів, стимульованих інтерфероном (ISG), які кодують різні противірусні ефектори [109]. Примітно, що продукція INF-β призводять до позитивного зворотного зв'язку: ще більше стимулює експресію багатьох генів INF-α [110].

Противірусна функція IFN типу I опосередковується спектром ISG, що підсилює виявлення вірусів і гальмування вірусної реплікації, синтез вірусного білка, а також збір і вивільнення частинок вірусного потомства [109].

Молекула INF-α-2b - це глікопротеїн, що складається з 166 амінокислот з О-глікозильованим траоніном в положенні 106. Два дисульфідні зв'язки утворюються цистеїнами в положеннях 1 і 98, а також 29 і 138. Зв'язок, утворений позиціями 1 і 98, не потрібен для біологічної активності. Амінокислотними залишками, важливими для біологічної активності, є Leu30, Lys31, Arg33, His34, Phe36, Arg120, Lys121, Gln124, Tyr122, Tyr129, Lys131, Glu132, Arg144 [106]. На основі кристалічної структури, опосередкованої цинковим димером, кожен мономер INF-α-2b складається з п'яти альфа-спіралей (названих від A до E), які з'єднані петлями AB, BC, CD та DE. Амінокислотні залишки, важливі для структурної цілісності: Phe36, Tyr122 і Tyr129. Залишки, які важливі для зв'язування з рецептором, є петлею AB (Arg22, Leu26, Phe27, Leu30, Lys31, Arg33 і His34), спіраллю B (Ser68), спіраллю C (Thr79, Lys83, Tyr85 і Tyr89) спіраль D (Arg120, lys121, Gln124, Lys131 та Glu132) та спіраль E (Arg144 та Glu146) [106]. На рис 1.4 представлена структура IFN-α-2b.

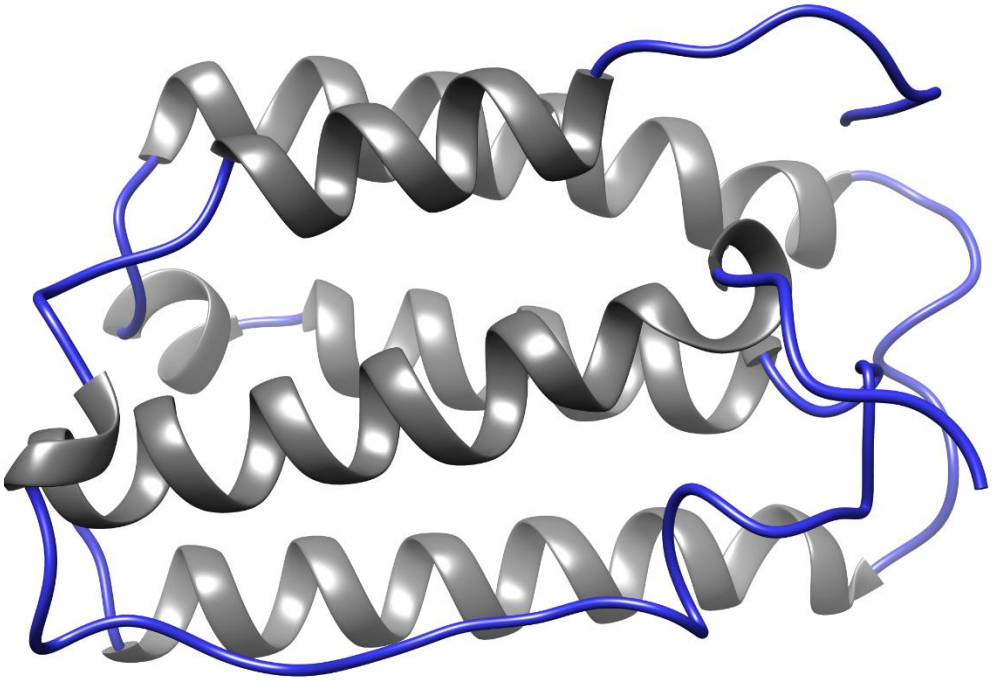


Рисунок 1.4 Структура IFN-α-2b, отримана методом гомологічного моделювання (SWISS-MODEL) на основі структури 2kz1.1.A (тотожність амінокислотних послідовностей 98.79%).

У зв'язку з пандемією COVID-19 найактуальніші саме противірусні ефекти IFN-α-2b. Під час спалаху SARS-CoV 2003 року в Торонто, Канада, лікування госпіталізованих пацієнтів INF-α призвело до прискореня пригнічення аномалій легень [112]. Лікування IFN-α або IFN-β в концентрації 50 МО/мл зменшує титри вірусу на 3.4 log або більше 4 log в клітинах Vero [1]. Ці результати демонструють потенційну ефективність людського INF I типу при придушенні інфекції SARS-CoV-2.

Лікування COVID-19 за допомогою INF-α-2b з арбідолом або без нього значно скоротило тривалість виявлення вірусу у верхніх дихальних шляхах і паралельно зменшувало тривалість підвищених рівнів маркерів запалення IL-6 і CRP в крові [1]. Ці результати свідчать про ефективність IFN-α-2b у терапії при COVID-19.

Важливо відзначити, що терапія IFN-α-2b, скоріше за все, скорочує тривалість вивільнення вірусу. Вважається, що IFN-α-2b діє у функціональному ланцюзі причинно-наслідкових зв'язків, де патофізіологічним фактором є викликане вірусом запалення. Інгаляція IFN-α-

2b прискорює виведення вірусу з дихальних шляхів і прискорює пригнічення системних запальних процесів в порівнянні з лікуванням тільки арбідолом [1].

Крім того, INF-α показує високі показники в лікуванні злоякісних пухлин. Фармакологічні дози частково очищених INF-α можуть викликати регрес пухлини у значної кількості пацієнтів з метастатичним раком молочної залози, низькосортною лімфомою і множинною мієломою [113].

Антипроліферативна активності IFN-α складається з прямої і непрямої дії. Пряма активність проявляється через гальмування росту ракових клітин шляхом гальмування клітинного циклу, апоптозу або диференціації. Непряма активність проявляється через активацію імунних клітин, таких як Т-клітини і природних клітин-вбивць. Антипроліферативна активність є результатом регулювання експресії генів, що ініціюється сигнальними шляхами та транскрипційною активацією JAK-STAT [106]. Дослідження експресії генів при меланомі, фібросаркомі, ембріональних фібробластах і дендритних клітинах людини показали, що людський IFN-α регулює понад 300 генів сигнальних шляхів в клітинах [114, 115]. Механізм дії людського IFN-α-2b при впливі на ріст різних ракових клітин здійснюється за рахунок передачі сигналу JAK-STAT.

INF-α відіграє важливу роль у переході імунної системи від вродженої реакції на адаптивну (рис. 1.5). Цей перехід має вирішальне значення для ефективного видалення всіх чужорідних антигенів та підтримки імунологічної пам’яті. Було показано, що INF-α впливає на численні типи клітин, включаючи індукцію макрофагової активності, цитотоксичність NK-клітин, а також зниження активації нейтрофілів. Ці дії перекривають функції інших цитокінів ранньої реакції(TGF- і IL-2), і в деяких ситуаціях можуть викликати синергетичну відповідь [111].

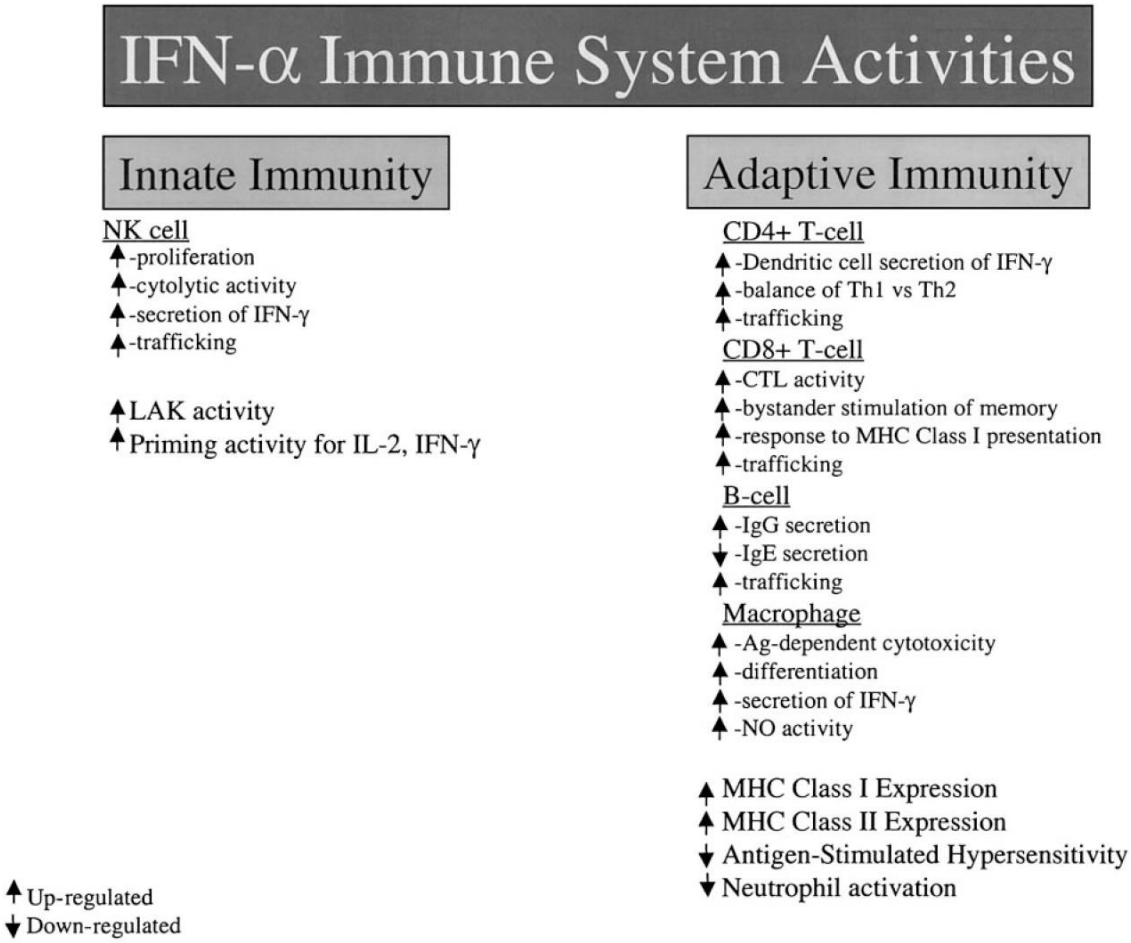


Рисунок 1.5 Імунологічна активність INF-α [111].

Як імуномодулюючий цитокін, INF-α прямо або побічно регулює транскрипцію декількох цитокінових і хемокінових шляхів. Пряме регулювання транскрипції відбувається після того, як ліганд зв’язується з рецептором I типу INF і ініціює сигнальний каскад (рис. 1.6), який включає членів сімейств JAK і STAT. Оскільки пряма регуляція транскрипції залежить від дози, часу і типу клітин, це підкреслює різноманітність властивої INF активності і різницю між терапією високими і низькими дозами.

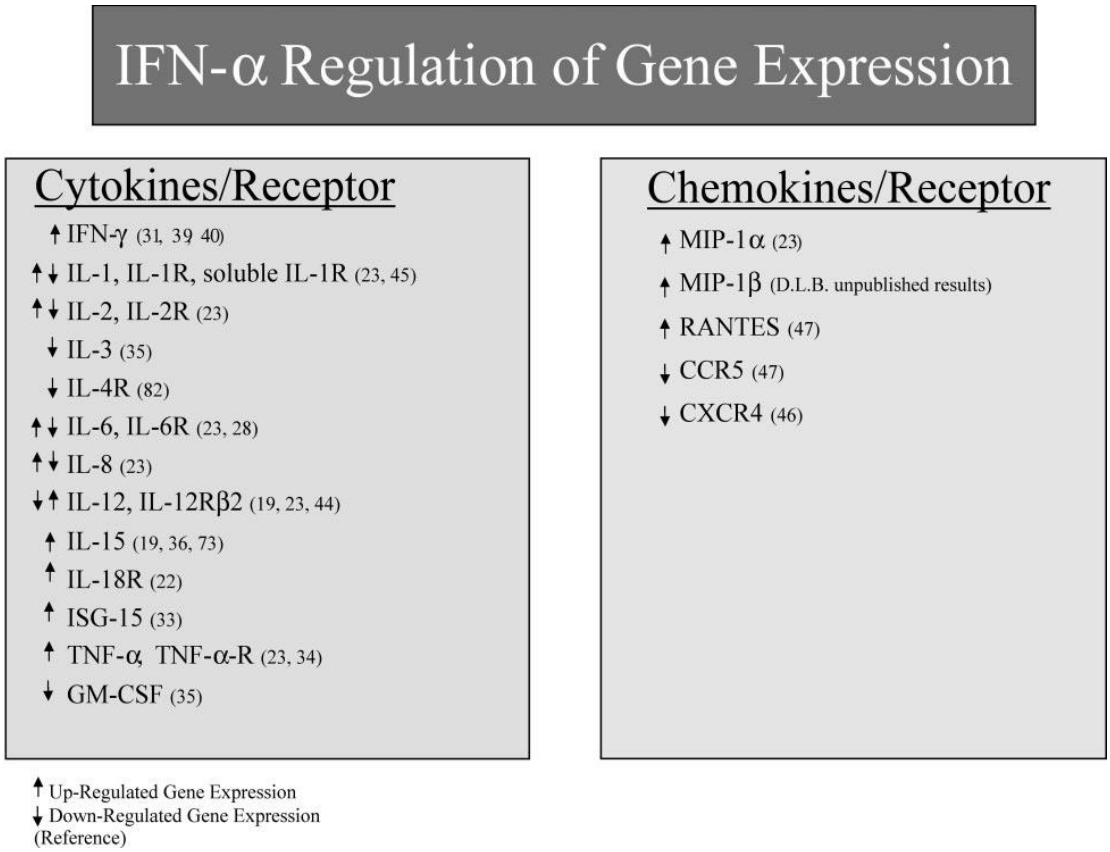
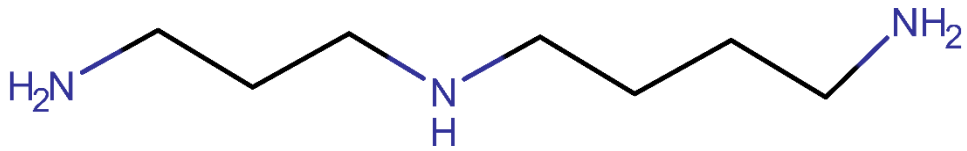


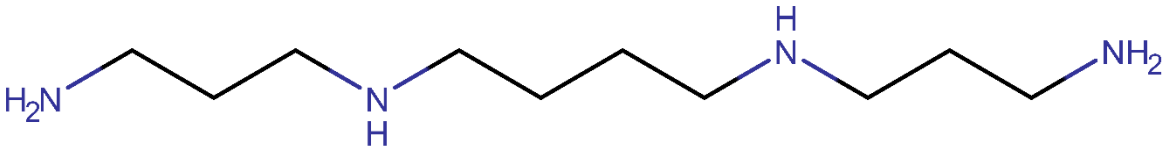
Рисунок 1.6 Регуляція INF-α експресії генів

1.4 Спермідін

Спермідин і спермін - це аліфатичні поліаміни (рис. 1.7), які широко поширені у всіх організмах, від бактерій до людини.



А



Б

Рисунок 1.7 Структурні схеми спермідину (А) та сперміну (Б).

Спермідин проявляє плейотропні ефекти, які включають протизапальні властивості, антиоксидантні функції, посилену метаболічну функцію, мітохондріальну функцію, а також поліпшення активності протеостаз та

шаперонів. Багато з антивікових ефектів спермідину причинно пов’язані зі здатністю цього поліаміну викликати цитопротекторну аутофагію. Аутофагія забезпечує загальний клітинний гомеостаз та протеостаз і безпосередню впливає на деградацію пошкоджених, потенційно токсичних органел і шкідливих білкових агрегатів, тим самим видаляючи і переробляючи цитоплазматичний матеріал, який в іншому випадку накопичувався б зі старінням. Додатковий запас спермідину продовжує тривалість життя різних видів аутофагійно-залежним способом і протидіє віковим патологіям, таким як серцево-судинні захворювання, нейродегенерація і рак. Спермідин також знижує ріст пересаджених пухлин, стимулює протиракову імунну відповідь в поєднанні з хіміотерапією і пригнічує канцерогенез, викликаний хімічним пошкодженням у мишей. Крім того, збільшення дієтичного споживання поліамінів корелює зі зниженням смертності від серцево-судинних захворювань і раку в дослідженнях людини [116].

Поліаміни мають важливе значення для росту і проліферації клітин, а також для регенерації тканин. Вони зв’язують і стабілізують ДНК і РНК, мають антиоксидантну активність, модулюють функції ферментів і необхідні для регуляції трансляції [117, 118]. Поліаміни також були охарактеризовані значущими в контролі апоптозу [117, 118] і в контексті навчання та пам’яті [119]. Спермідин діє як природний індуктор аутофагії [120] і може бути використаний як омолоджуючий засіб.

Концентрація спермідину в тканинах знижується з віком як у модельних організмів, так і у людини [120]. Це може бути результатом зниження біосинтетичної активності поліамін-продукуючих ферментів [121].

Вміст внутрішньоклітинного спермідину є кінцевим результатом всмоктування поліамінів з позаклітинного простору, ендогенного біосинтезу, катаболізму і екскреції. Біосинтез досягається з попередника орнітіну для формування путрецину, спермідину і сперміну в регульованих ступінчастих реакціях [117, 118]. Катаболізм поліамінів передбачає окислювальну деградацію сперміну до спермідину. Поліаміни також взаємодіють з важливим

метаболізмом амінокислот при захворюваннях. Через орнітин, попередник путрецину, біосинтез поліаміну впливає на біодоступність аргініну, що важливо для виробництва оксиду азоту (NO) - важливою сигнальної молекули[122]. Клітинне поглинання і секреція поліамінів також можуть бути опосередковані ендоцитозом і екзоцитозом відповідно.

На додаток до клітинного біосинтезу, зовнішнє (оральне) засвоєння з їжею і вироблення кишковими мікроорганізмами однаково важливі для системної доступності спермідину. Окремі необроблені рослинні продукти природним чином збагачені поліамінами (наприклад, плоди дуріана). Більш того, процеси бродіння за участю бактерій і грибків, що використовуються в харчовій промисловості, викликають мікробне утворення поліамінів, що іноді може спричиняти суб'єктивно неприємні запахи молока і соєвих продуктів. Поглинуті спермін і спермідин швидко всмоктуються з кишечника і розподіляються без деградації [123]. Середньодобове споживання спермідину з їжею коливається від ~ 7 до 25 мг і більше. У мишей пероральне введення спермідину збільшує кількість спермідину в крові [124], сироватці [125] і тканинах [124]. Системні концентрації поліамінів також контролюються нирковою секрецією.

На додаток до здатності поліпшити клітинну адаптацію, як це було показано в дріжджах, рослинах і культивованих клітинах ссавців, поліаміни (особливо спермідин) збільшують тривалість життя багатоклітинних організмів, включаючи нематод, мух і мишей. Серцево-судинні захворювання і рак є двома основними причинами смерті у людей і мишей. Спермідин може затримати їх прояв і зменшити тяжкість у моделей гризунів.

Поліаміни мають важливе значення для проліферації і росту клітин, а дисрегуляція метаболізму поліамінів є визначальною особливістю багатьох типів пухлин; підвищені концентрації поліамінів можуть бути виявлені при раку шкіри, молочної залози, товстої кишки, легень і передміхурової залози [126]. Спермідин підсилює протиракову імунну відповідь, оскільки витісняє імуносупресивні клітини (як регуляторні Т-лімфоцити) з локалізації пухлини

[127].

Дієтичний спермідин захищає від старіння серця, покращує діастолічну функцію, еластичність лівого шлуночка і мітохондріальну функцію у літніх мишей [124]. Перші результати епідеміологічних досліджень підтверджують ці висновки у людини: споживання дієтичного спермідину (або спермідину і сперміну в комбінації) обернено корелює з частотою серцево-судинних захворювань і смертністю[124].

Однією з ознак старіння є зниження функції стовбурових клітин, що призводить до порушення регенерації тканин і ослаблення імунітету [128]. Спермідин сприяв перепрограмуванню соматичних клітин в індуковані плюрипотентні стовбурові клітини ембріональних фібробластів миші *in vitro* [129], а також стимулював ріст волосся і функцію епітеліальних стовбурових клітин в культурах волосяних фолікулів людини [130]. Спермідин-опосередковане ультраструктурне і функціональне поліпшення мітохондрій старіючих серцевих м'язів [124] і скелетних м'язів стовбурових клітин [131] додатково підтверджує потенційну користь спермідину при лікуванні захворювань, пов'язаних з м'язами.

Аутофагія (і особливо мітофагія) відіграє важливу роль у підтримці нормальної функції мозку і захисті від нейродегенерації [132], а добавка спермідину надає нейропротекторну дію *in vivo*.

Аутофагія необхідна для адаптації ракових клітин до внутрішньо клітинного і зовнішнього стресу. Однак майже смертельна аутофагія також сприяє імунному виявленню ракових клітин, оскільки сприяє вивільненню аденозину-5'-трифосфату (АТФ), який служить хемотактичним фактором для мієлоїдних клітин, включаючи попередників дендритних клітин [133]. Індукція аутофагії спермідином сприяє вивільненню АТФ з неопластичних клітин у мишей [127]. Спермідин також безпосередньо покращує формування і функцію лімфоцитів пам'яті, подібно до рапаміцину [133] або метформіну [134]. Функція Т-клітин знижується з віком, і це зниження пов'язане з порушенням аутофагії [135].

Екзогенні спермідин і спермін пригнічують секрецію прозапальних цитокінів в численних патофізіологічних умовах. Ці ефекти частково вторинні відносно індукції аутофагії, так як аутофагія має широку протизапальну дію, яка частково залежить від гальмування активації запальних процесів [136]. Дієтичний спермідин пригнічує вікове хронічне легке збільшення фактора некрозу пухлини та інших цитокінів у плазмі мишей [124] і пригнічує смертельний сепсис [138].

Поліаміни можуть бути використані як біомаркери захворювань, зокрема, раку, нейродегенеративних захворювань, інсульту та ниркової недостатності [138], а також серцевої недостатності та інфаркту міокарда [139]. Крім того, порушення метаболізму поліамінів і аргініну спостерігається у мишачих моделях хвороби Альцгеймера [140] і у пацієнтів з легкими когнітивними порушеннями [141].

Спермідин і спермін пригнічують інфекцію SARS-CoV-2, мабуть, викликаючи деградацію вірусу в ендосомах [142].

1.5 Нітазоксанід

Нітазоксанід (NTZ) або 2-(ацетилокси)-*N*-(5-нітро-2-тіазоліл)бензамід (рис. 1.8) був вперше синтезований на початку 1970-х років на основі ніклозаміду шляхом заміни одного бензолового кільця шестичленним гетероцикловим кільцем, нітротіазолом, 5-членним кільцевим гетероциклом [144].

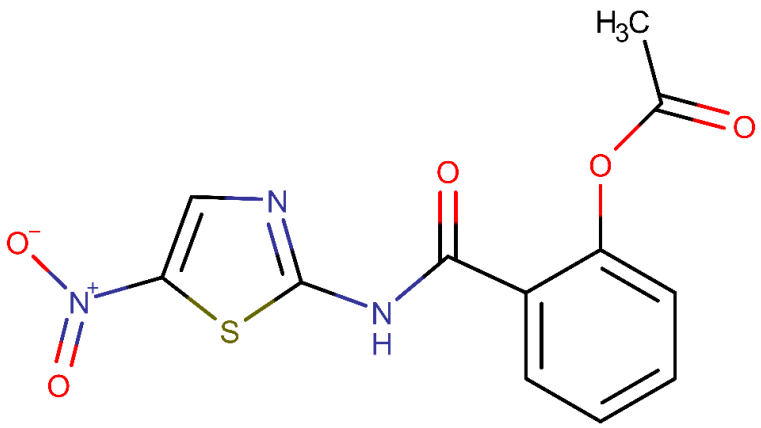


Рисунок 1.8 Структурна формула нітазоксаніду.

Нітазоксанід спочатку був розроблений як протипаразитичний засіб для перорального застосування і вивчався в застосуванні проти найпростіших і гельмінтних інфекцій *in vitro* та/або *in vivo* у мишей, кішок, собак і овець [145]. Вперше він був вивчений у людини для лікування цестод кишечника [146]. Пізніше було встановлено, що нітазоксанід ефективний в аналізі клітинної культури і в декількох моделях тварин проти внутрішньоклітинних найпростіших *Cryptosporidium parvum* [147] і він був ліцензований в США (Alinia®, Romark Laboratories) як препарат для лікування діареї, викликаної *C.parvum* і *Giardia intestinalis*, у дорослих і дітей не молодше 12 місяців [148]. Це перше і єдине схвалене лікування інфекції *Cryptosporidium parvum*. Нітазоксанід також широко використовується в Латинській Америці та Індії, де він показаний для лікування широкого спектру кишкових паразитарних інфекцій.

На додаток до своєї протипаразитичної активності, нітазоксанід і його активний циркулюючий метаболіт тізоксанід (TIZ, рис. 1.9) активні *in vitro* проти широкого спектру анаеробних грампозитивних і грамнегативних бактерій [149].

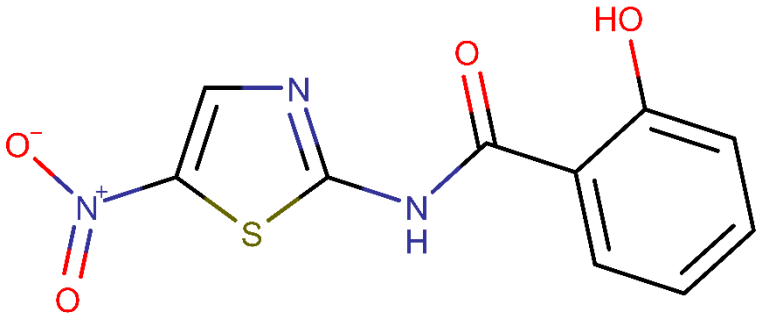


Рисунок 1.9 Структурна формула активного метаболіту нітазоксаніду – тізоксаніду.

Дослідження на тваринах і клінічні випробування підтвердили активність препарату при лікуванні *Clostridium difficile* [150]. Автори вивчали механізм дії нітазоксаніду проти анаеробних бактерій і найпростіших. Було показано, що нітазоксанід пригнічує ферментозалежні реакції перенесення

електронів піруват ферредоксин-оксидоредуктази, які необхідні для анаеробного енергетичного обміну. Дослідження *M. tuberculosis* показали, що нітазоксанід діє як роз'єднувач, порушуючи мембранний потенціал і гомеостаз pH всередині організму [151].

В останні роки лабораторні дослідження виявили широкий спектр противірусної активності нітазоксаніду, доповнюючи напрочуд широкий спектр дії цього препарату і спонукаючи до зусиль впроваджувати нітазоксанід та інші тіазоліди як новий клас противірусних засобів.

NTZ легко гідролізується і перетворюється в TIZ у водних буферах [152]. Кілька досліджень *in vitro* показали, що TIZ індукує гальмування реплікації шістнадцяти різних штамів вірусів грипу A і одного вірусу грипу B [153].

Тілманіс та ін. повідомили про потужний противірусний ефект TIZ проти 210 сезонних вірусів грипу, а також вірусів, стійких до інгібіторів нейрамінідази (таблиця 1.1), включаючи озельтамівір, занамівір, перамівір і ланінамівір [154].

Таблиця 1.1 [155]

Virus	**Dose**	**Compound**
Canine coronavirus S-378	IC_{50}, 1 μg/ml	TIZ
Bovine coronavirus (L9)	IC_{50}, 0.3 μg/ml	NTZ
Murine coronavirus	IC_{50}, 0.3 μg/ml	NTZ
Mouse hepatitis virus (A59)	IC_{50}, 0.3 μg/ml	NTZ
Human enteric coronavirus (4408)	IC_{50}, 0.3 μg/ml	NTZ
MERS-CoV	IC_{50}, 0.92 μg/ml	NTZ
MERS-CoV	IC_{50}, 0.83 μg/ml	TIZ
SARS-CoV-2	IC_{50}, 2.12 μM	NTZ
Influenza A strains	IC_{50}, 0.2–1.5 μg/ml	TIZ
Influenza B/Parma/3/04	IC_{50}, 0.2–1.5 μg/ml	TIZ
Rotavirus: the human Wa-G1P (8)	IC_{50}, 1 μg/ml	TIZ

Rotavirus: simian SA11-G3P (2)	IC_{50}, 0.5 μg/ml	TIZ
Norovirus G1 replicon assay system	IC_{50}, 0.5 μg/ml	TIZ
Human astrovirus	IC_{50}, 1.47 μM	NTZ
Adenovirus enteritis	500 mg twice daily	NTZ
Paramyxovirus	IC_{50}, 10 μg/ml	NTZ
Ebola virus	IC_{100}, 20–40 μM	NTZ
HCV genotype 1a	IC_{50}, 0.09 μg/ml	TIZ
HCV genotype 1b	IC_{50}, 0.06 μg/ml	TIZ
HBV in clinical trials	500 mg daily	NTZ
Chikungunya virus	IC_{50}, 2.96 μM	NTZ
Rubella virus	IC_{50}, 0.35 μg/ml	NTZ
Vaccinia virus	IC_{50}, 2 μM	NTZ
HIV	IC_{50}, 0.5 μg/ml	NTZ
HIV	IC_{50}, 0.5 μg/ml	TIZ
Human cytomegalovirus	IC_{50}, 3.2 μM	NTZ
Dengue-2 virus	IC_{50}, 0.1 μg/ml	TIZ
Yellow fever virus	IC_{50}, 0.06 μg/ml	TIZ
Japanese encephalitis	IC_{50}, 0.12 μg/ml	NTZ

У 2020 році, після поширення COVID-19, Ванг та ін. повідомили, що NTZ може пригнічувати SARS-CoV-2 в клітинах Vero E6 після зараження при низьких мікромолярних концентраціях [156]. Нещодавно Келені запропонував використовувати NTZ з азитроміцином як протокол для ранніх випадків COVID-19 [157]. Крім того, Пепперел та ін. розглянули опубліковані клінічні випробування NTZ для визначення безпеки препарату, а також розрахували мінімальну вартість виготовлення препарату для потенційного застосування в лікуванні COVID-19 (рис. 1.10) [158].

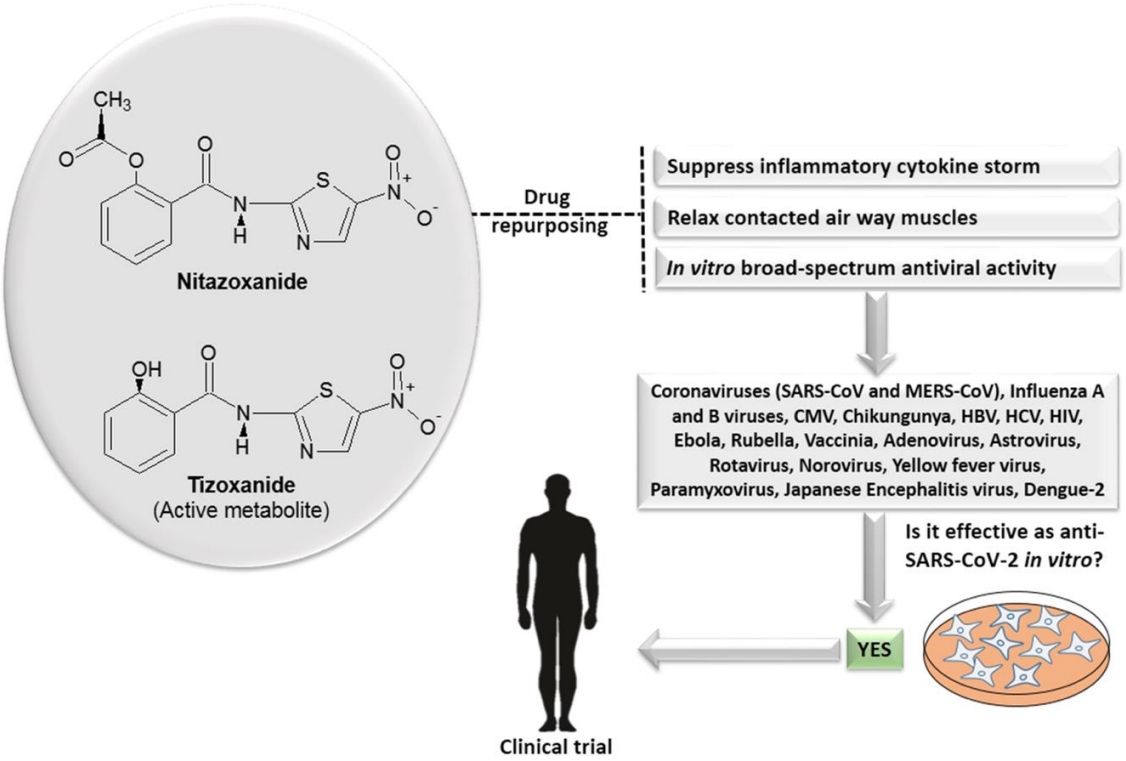


Рисунок 1.10 Дослідження перепрофілювання NTZ та TIZ [158].

Перепрофільований препарат нітазоксанід та його активний метаболіт тізоксанід є перспективними препаратами для клінічних випробувань проти COVID-19 завдяки своїй здатності контролювати надмірні запальні імунні реакції, бронходилататорній дії та активності *in vitro* проти SARS-CoV-2 [155].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1

Лізоцим складається з 127-130 амінокислот та має високу термічну та pH-стабільність завдяки наявності дисульфідних зв'язків. Його антивірусні ефекти розширюють функції як антимікробного агента з високою ферментативною активністю та ефективністю проти різних патогенів, включаючи бактерії та віруси. Лізоцим стимулює імунну відповідь завдяки сприянню виробництва інтерлейкінів та інтерферонів і зменшенню прозапальних реакцій. Екзогенний лізоцим нейтралізує прооксидантні речовини та зменшує окислювальний стрес, тобто демонструє імуносупресивні ефекти.

Лактоферин складається з 691 амінокислоти та є залізозв'язуючим глікопротеїном. Структурно сформований двома доменами, кожен з яких має здатність зв'язувати залізо. Ця властивість дозволяє лактоферину впливати на гомеостаз заліза в організмі, що є ключовим у контексті інфекційних захворювань, таких як COVID-19. Лактоферин має виражені противірусні ефекти, зокрема проти SARS-CoV-2, завдяки також своїй здатності блокувати вірусні рецептори та запобігати проникненню вірусу в клітини. Ці властивості роблять його перспективним засобом для профілактики та лікування вірусних інфекцій. Крім того, лактоферин проявляє імуномодулюючий ефект та зменшує запальні реакції і посилює антиоксидантний захист. Це може бути особливо важливим у контексті системного запалення, що спостерігається при COVID-19. Амінокислотна структура глікопротеїна забезпечує його біологічну активність, включаючи противірусні та антимікробні ефекти, а також здатність до імуномодуляції.

Інтерферон α-2b – це глікопротеїн зі специфічною структурою та амінокислотним складом, який індукує експресію широкого спектру генів, для боротьби з інфекціями та впливає на ріст клітин, їхню диференціацію та імунну активність. Така регуляція охоплює не лише противірусну активність, але й антипроліферативну, що може бути використано для лікування ракових захворювань. Інтерферон α-2b має значний противірусний потенціал,

особливо у контексті COVID-19, де він сприяє скороченню тривалості інфекції та запальних реакцій в організмі.

Спермідин – це аліфатичний поліамін. Серед біологічних функцій можна виділити: протизапальні властивості, антиоксидантну дію, поліпшення метаболічної та мітохондріальної функцій. Окрім цього, його можна використати як біомаркер для діагностики та моніторингу ряду захворювань, як-от: рак, нейродегенеративні захворювання, інсульт та серцево-судинні патології. За рахунок сприяння деградації вірусу спермідин має потенціал у лікуванні інфекцій, таких як SARS-CoV-2. Враховуючи його широкий спектр біологічних ефектів, спермідин представляє значний інтерес для подальших досліджень.

Нітазоксанід був розроблений як антипаразитний агент, проте має також широкий спектр антибактеріальної та противірусної активності проти широкого спектру анаеробних бактерій та вірусів, включаючи віруси грипу, коронавіруси, вірус гепатиту С і навіть віруси, стійкі до інгібіторів нейрамінідази. Його дія заснована на інгібуванні ферментозалежних реакцій перенесення електронів, необхідних для анаеробного енергетичного обміну мікроорганізмів, і порушенні мембранного потенціалу та гомеостазу pH. Нітазоксанід показав здатність пригнічувати SARS-CoV-2 в клітинних культурах, що робить його потенційним кандидатом для лікування захворювання в контексті пандемії COVID-19.

РОЗДІЛ 2 КОМП'ЮТЕРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ

Для моделювання докінгу було обрано нативний лізоцим людини (PDB-ID 1REX), рекомбінантний людський лактоферин (PDB-ID 1b0l), нітазоксанід (DrugBank Accession Number DB00507) та спермідин (DrugBank Accession Number DB03566). Оскільки у банку даних не знайшлося потрібної моделі інтерферону α-2b, було вирішено виконати гомологічне моделювання для отримання тримірної структури білка.

Для початку було обрано амінокислотну послідовність INF-α-2b з бази даних DrugBank (Accession Number – DB00105). Наступні кроки проводилися у програмному застосунку SWISS-MODEL, а саме: пошук найбільш спорідненої послідовності (SMTL ID G7PS91.1.A – інтерферон α-6), вирівнювання послідовностей, моделювання структури, оптимізація та уточнення моделі, валідація моделі. Завдяки високій спорідненості поліпептидних ланцюгів (84.85%) було отримано модель з оцінкою якості 90% (SWISS-MODEL) або 98.08% за даними аналізу UCLA-DOE LAB. Окрім того, було побудовано графік Рамачандра (рис. 2.1) що підтверджує попередні результати.

За результатами аналізу 96.93% амінокислотних залишків відповідають найбільш стабільним і енергетично вигідним кутам що є ознакою того, що більшість амінокислотних залишків мають конформації, які є типовими для правильно згорнутих білків. Також враховуючи те, що 0% амінокислотних залишків знаходяться поза допустимими областями на графіку Рамачандрана та наявно лише 1.32% амінокислотних залишків з конформаціями бічних ланцюгів, які рідко спостерігаються в кристалічних структурах, можна стверджувати про високу якість отриманої структурної моделі.

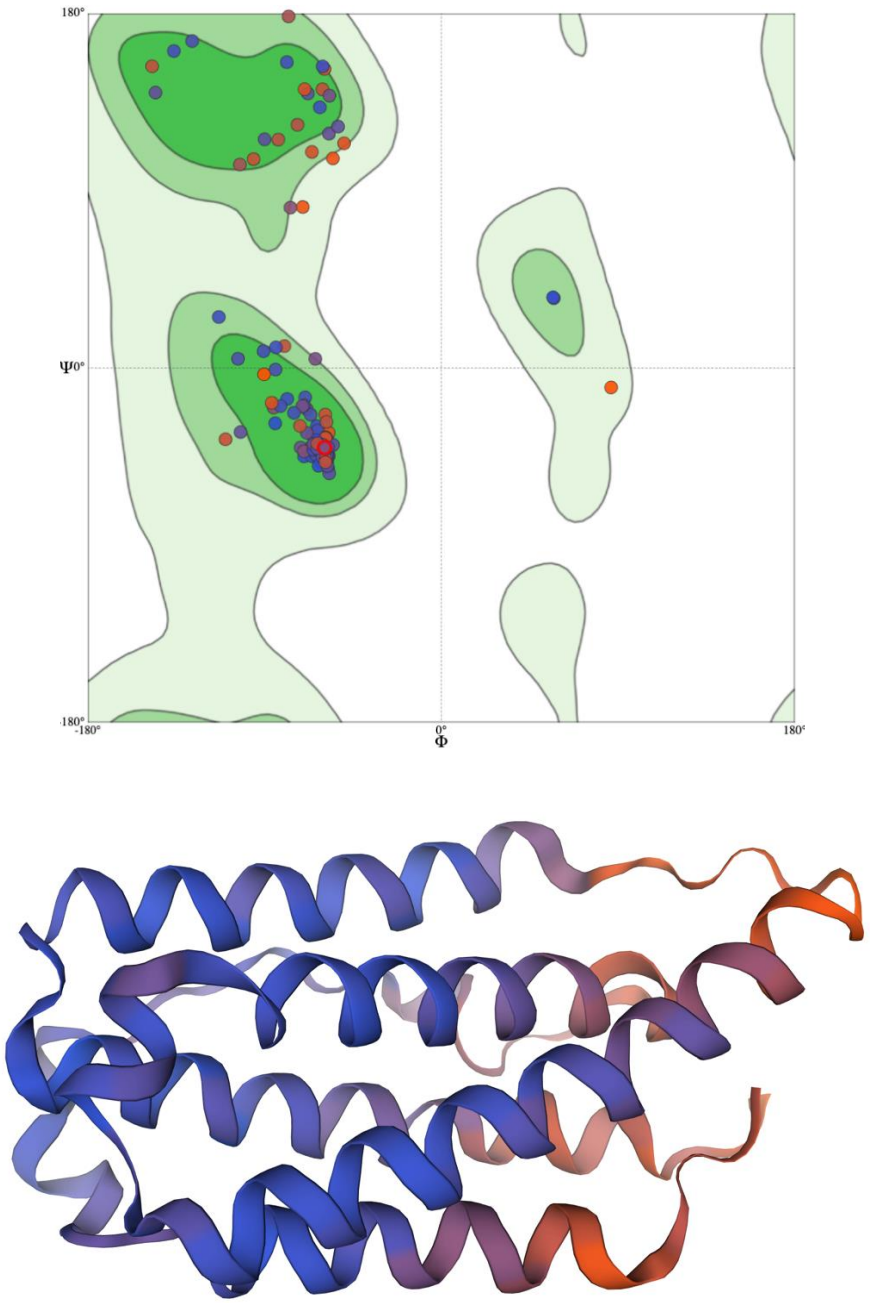


Рис. 2.1 Графік Рамачандра для моделі інтерферону α-2b

Молекули малих лігандів (спермідину та нітазоксаніду) були створені за допомогою програмного забезпечення MarvinSketch, геометрія оптимізована за допомогою Avogadro, а також виконано розрахунки зарядів для силових полів та параметрів силових полів за допомогою R.E.D. Server.

Дослідження проводили з використанням двох сервісів – SwissDock та PatchDock для уточнення результатів шляхом порівняння. Аналіз результатів виконано за допомогою програм UCSF Chimera, BIOVIA Discovery Studio та Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP). Результати з BIOVIA Discovery Studio

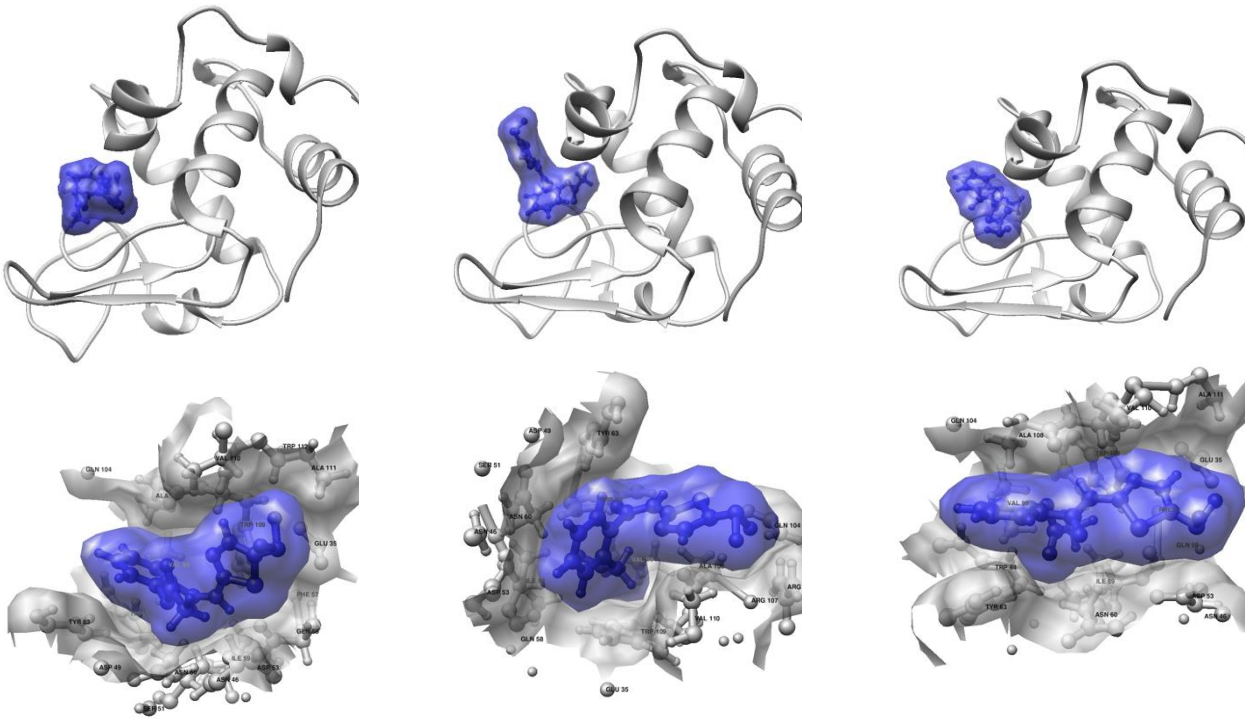
та PLIP використовували як взаємодоповнюючі. З результатів SwissDock та PatchDock було обрано по три сайти зв’язування з найвищою енергією з різних кластерів (різні положення ліганду на білку).

Також було проведено додаткове дослідження розподілу електростатичного потенціалу у сайті зв’язування на поверхні чистого білка та комплексу білок-ліганд за допомогою серверу PDB2PQR & APBS.

2.1 Лізоцим та нітазоксанід

2.1.1 SwissDock

На рисунку 2.2 зображено візуалізацію відібраних 3-х комплексів лізоцим-нітазоксанід, отриманих за допомогою програми SwissDock.



Комплекс 1 Комплекс 2 Комплекс 3

Рис. 2.2 Візуалізація комплексів лізоцим-нітазоксанід з програми SwissDock за допомогою UCSF Chimera.

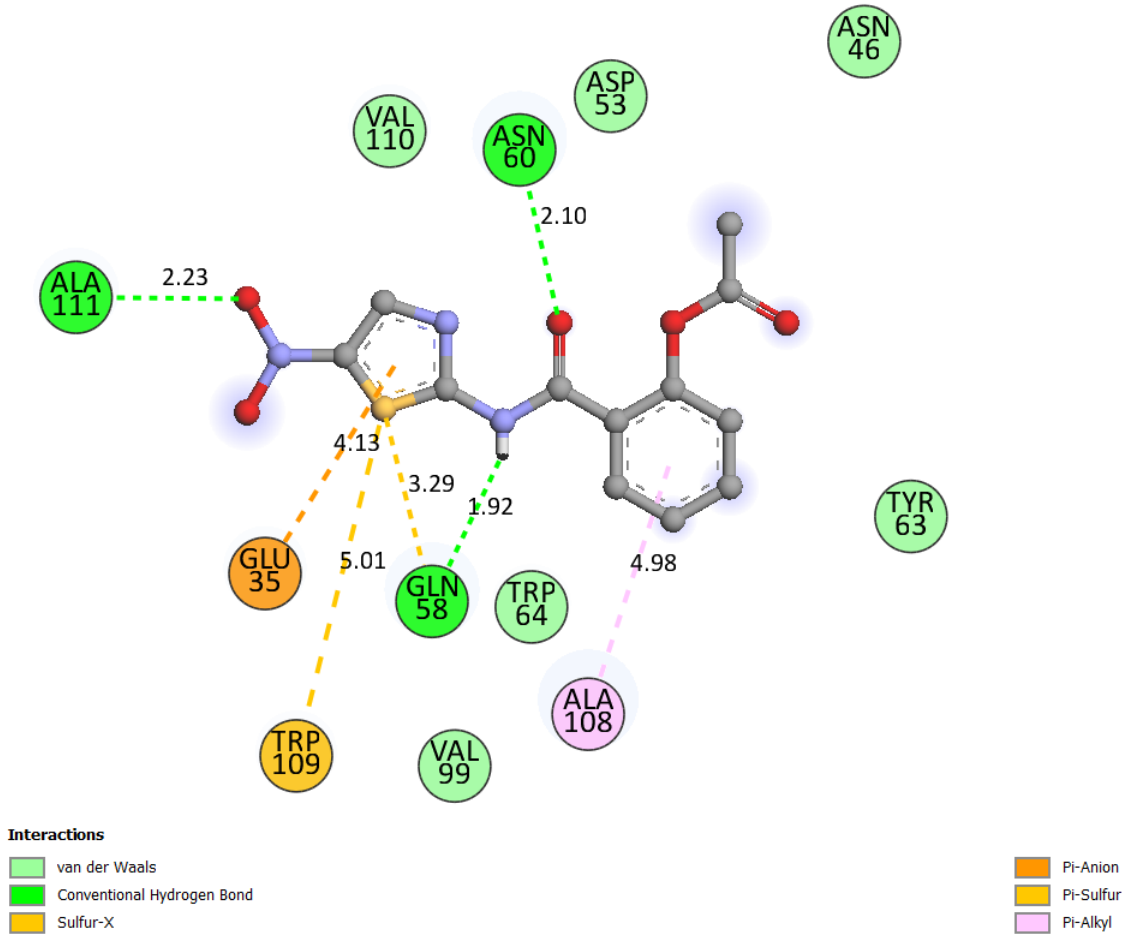
Видно, що нітазоксанід переважно розміщений в рамках одної комірки для всіх трьох комплексів. Однак ліганд займає різні положення при зв’язуванні та, відповідно, взаємодіє з різними амінокислотами та має різні типи зав’язків, що детально зображено на рис. 2.3. Амінокислоти ALA:108,

TRP:109 є спільними для всіх 3-х комплексів, що може означати їх ключову роль в зв’язуванні нітозаксаміду з лізоцимом. Також привертають увагу GLN:58, VAL:110, TYR:63, ASP:53 та ASP:53 – спільні для кластерів 1 та 2 і GLN:104, VAL:99, TRP:64, ILE:59 – спільні для кластерів 2 та 3.

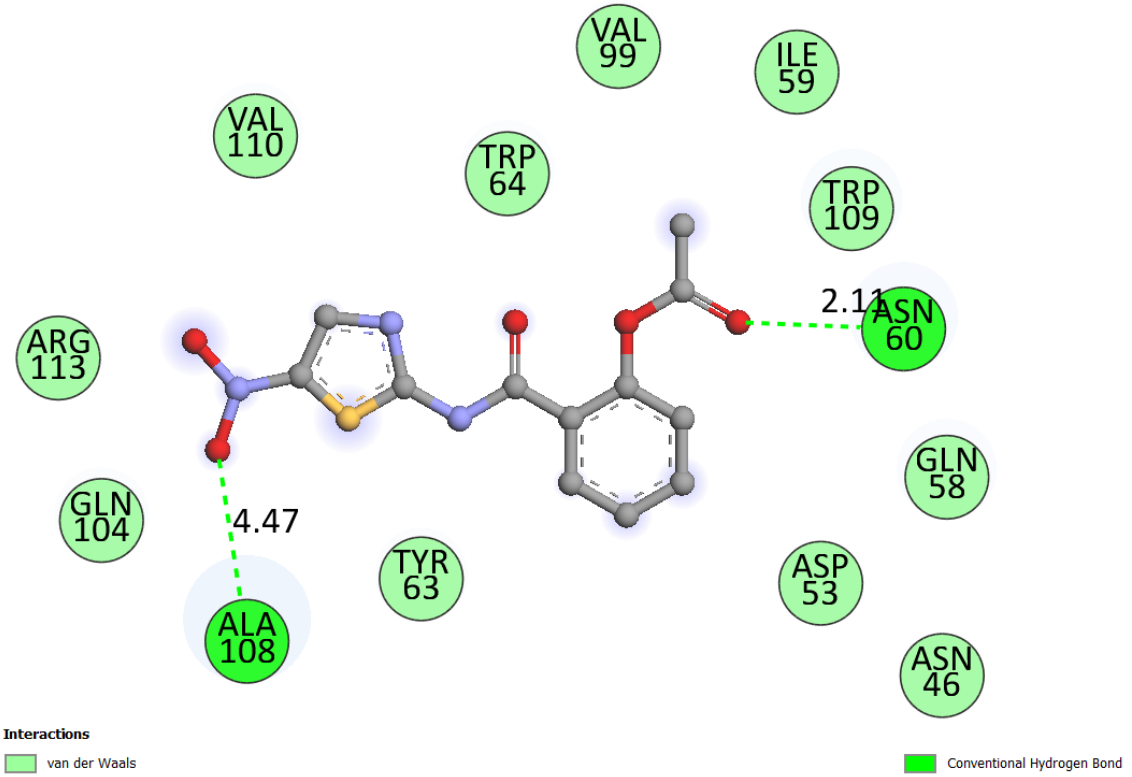
Перший комплекс має різні типи взаємодій: Pi-Alkyl, Pi-Sulfur, Pi-Anion, Sulfur-X, звичайні водневі зв’язки і ван-дер-ваальсові. Тобто як сильні, так і слабкі взаємодії. Сильні взаємодії: Pi-Sulfur і Sulfur-X (особливо за участю TRP:109 і GLN:58), які зазвичай є більш специфічними і значущими для структурної стійкості. Звичайні водневі зв’язки також є сильними взаємодіями, що сприяють стабільності структури білка.

Більшість амінокислот другого комплексу беруть участь у ван-дер-ваальсових взаємодіях, що може вказувати на мережу слабких взаємодій, які сприяють структурній гнучкості. Проте також присутні звичайні водневі зв’язки, які є більш сильними взаємодіями.

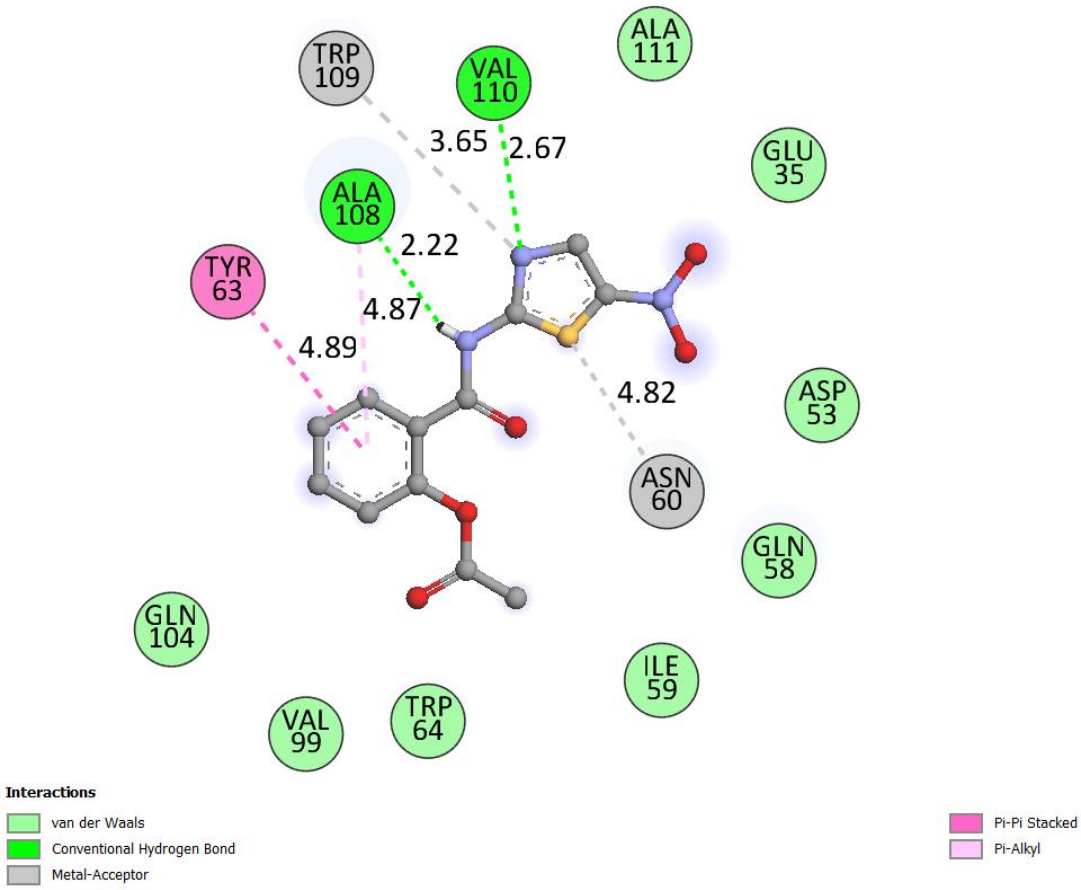
Комплекс 3 характеризується наявністю унікальних взаємодій: Pi-Pi Stacked і Metal-Acceptor, яких не виявлено в інших кластерах. Ці типи взаємодій можуть вказувати на специфічні структурні або функціональні особливості цього комплексу. Як і в попередніх, тут також присутні звичайні водневі зв’язки і ван-дер-ваальсові взаємодії.



Комплекс 1



Комплекс 2



Комплекс 3

Рис. 2.3 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів SwissDock лізоцим-нітазоксанід з у програмі BIOVIA Discovery Studio

Результати аналізу докінгу у програмі PLIP малоінформативні порівняно з Discovery Studio за кількістю взаємодій та різноманітністю типів зв'язку, проте узгоджуються з попереднім та несуть додаткову інформацію (рис. 2.4).

В аналізі PLIP ALA:108 бере участь у гідрофобних взаємодіях у комплексах 1 і 3. Це означає, що ALA:108 відіграє значну роль у формуванні гідрофобного ядра, що має вирішальне значення для стабільності комплексу білок-ліганд. Водневі зв'язки також важливі: GLN:58 і ASN:60 утворюють міцні водневі зв'язки в першому комплексі, а ASN:60 знову бере участь у водневих зв'язках комплекса 2. Ці водневі зв'язки важливі для специфічності зв'язування завдяки сприяння точній орієнтації ліганду.

Комплекс 2 показує, що ASN:60 і VAL:99 беруть участь у гідрофобних взаємодіях, причому ASN:60 утворює водневий зв'язок. Тобто ASN:60 є універсальним залишком, що сприяє як гідрофобному ядру, так і специфічному зв'язуванні за допомогою водневих зв'язків. Роль VAL:99 у гідрофобних взаємодіях говорить про його внесок у загальне гідрофобне середовище, сприятливе для зв'язування ліганду.

У кластері 3 ALA:108 знову бере участь у гідрофобних взаємодіях, що посилює його роль у гідрофобності контакту. Водневі зв'язки ALA:108 та VAL:110 у кластері 3 вказують на важливе значення для підтримки стабільності та орієнтації ліганду всередині сайту зв'язування.

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	108A	ALA	3.91	2030	1651

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	58A	GLN	1.92	2.91	163.22	×	✓	2035 [Nam]	922 [O2]
2	60A	ASN	2.10	3.06	162.38	✓	✓	942 [Nam]	2039 [O2]

Комплекс 1

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	60A	ASN	3.99	2029	946
2	99A	VAL	3.58	2042	1504

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	60A	ASN	2.11	3.06	159.21	✓	✓	942 [Nam]	2043 [O2]

Комплекс 2

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	108A	ALA	3.87	2032	1651

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	108A	ALA	2.22	3.18	158.50	×	✓	2035 [Nam]	1656 [O2]
2	110A	VAL	2.67	3.55	147.89	✓	✓	1681 [Nam]	2024 [N2]

Комплекс 3

Рис. 2.4 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів SwissDock лізоцим-нітазоксанід з у програмі PLIP

Порівнюючи аналіз PLIP з DS, ми бачимо, що ALA:108 бере участь у взаємодіях Pi-Alkyl та звичайних водневих зв'язках у DS, що узгоджується з його роллю у гідрофобних взаємодіях та водневих зв'язках. Така кореляція результатів обох аналізів дозволяє припустити, що ALA:108 є ключовим залишком у зв'язуванні нітазоксаніду з лізоцимом.

TRP:109, який з'являється у всіх кластерах DS, бере участь у безлічі взаємодій, включаючи Pi-Sulfur, Sulfur-X, ван-дер-ваальс та Metal-Aceptor. Ця різноманітність не повністю відображена в аналізі PLIP, що дозволяє припустити, що DS може дати детальніше уявлення про потенційні взаємодії TRP:109 з лігандом.

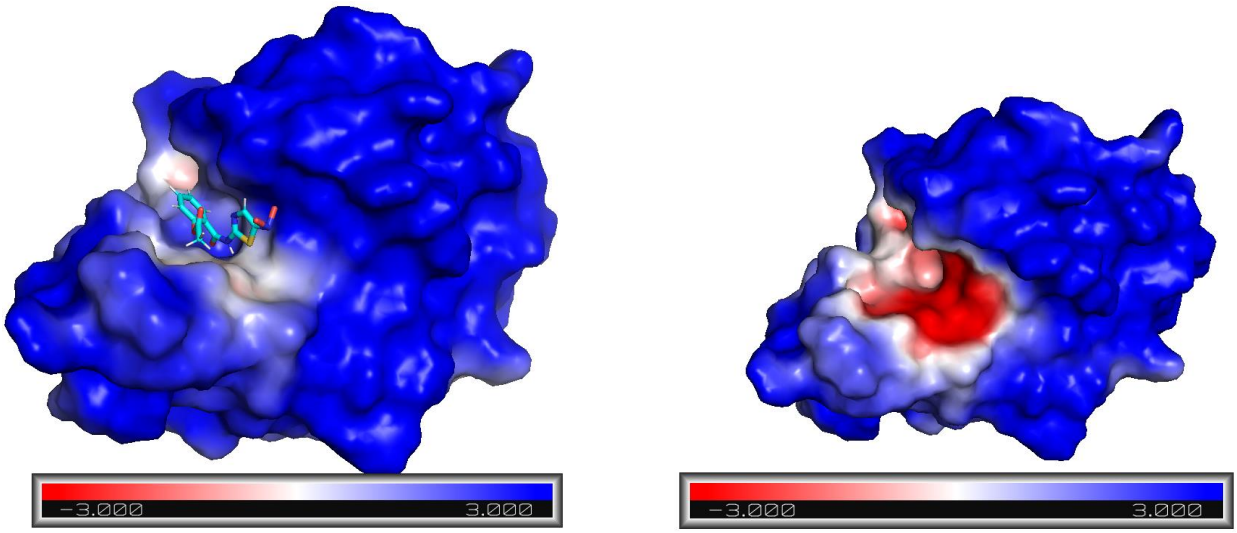
GLN:58 бере участь у взаємодіях Pi-Sulfur, Sulphur-X та ван-дер-ваальс в DS, що доповнює його роль у формуванні міцних водневих зв'язків у PLIP. GLN:58 може відігравати багатофункціональну роль як у стабілізації ліганду за допомогою водневих зв'язків, так і забезпечення специфічності зв'язування за допомогою інших взаємодій.

Участь VAL:110 у взаємодіях Ван-дерВаальса в DS узгоджується з його роллю в утворенні водневих зв'язків у PLIP, тобто цей залишок сприяє

стабільності ліганду на сайті зв’язування за допомогою кількох типів взаємодій.

В цілому, порівняння показує, що, хоча існують деякі відмінності в конкретних взаємодіях, виявлених за допомогою PLIP і DS, існує спільне щодо важливості певних залишків, таких як ALA:108, TRP:109, GLN:58 і VAL: 110, у зв’язування нітазоксаніду з лізоцимом Обидва аналізу вказують на складну комбінацію гідрофобних і водневих зв’язків при стабілізації ліганду в місці зв’язування білка.

Оскільки всі 3 сайти зв’язування відповідають 1 комірці на білку, для оцінки електростатичного потенціалу було достатньо проведення 1 моделювання для першого комплексу (рис. 2.5).



А Б

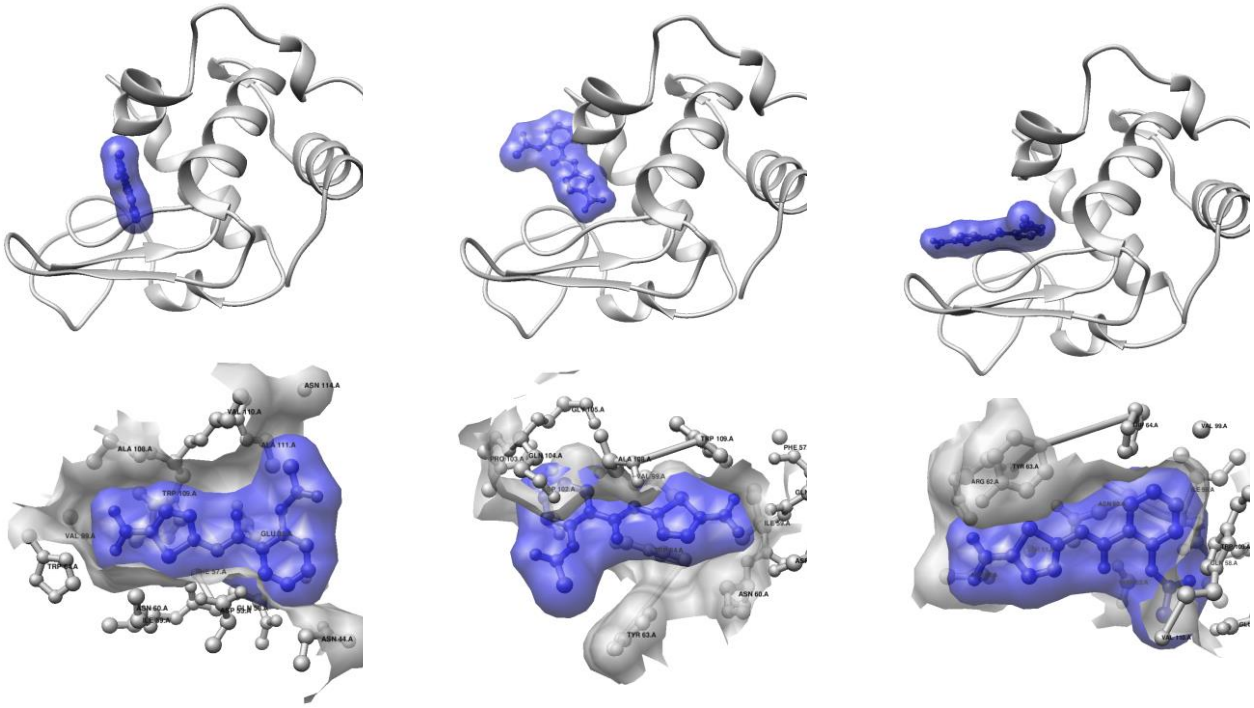
Рис. 2.5 Електростатичний потенціал на поверхні комплексу лізоцим-нітазоксанід (А) з програми SwissDock та чистого білка (Б).

Як видно з рисунку, сайт зв’язування містить амінокислотні залишки переважно з негативним електростатичним потенціалом. Це узгоджується з отриманими раніше результатами, а саме участю GLU, ASP (негативно заряджені), GLN, ASN, TYR (полярні амінокислоти). Зв’язування нітазоксаніду суттєво змінює електростатичних потенціал сайту зв’язування

до позитивно-нейтрального завдяки зміні електростатичного потенціалу, водневих та полярних взаємодій та, ймовірно, механізму індукованого диполя.

2.1.2 PatchDock

Відповідно як у випадку SwissDock, 3 комплекси з найвищою енергією зв'язку були візуалізовані у застосунку UCSF Chimera (рис. 2.6).



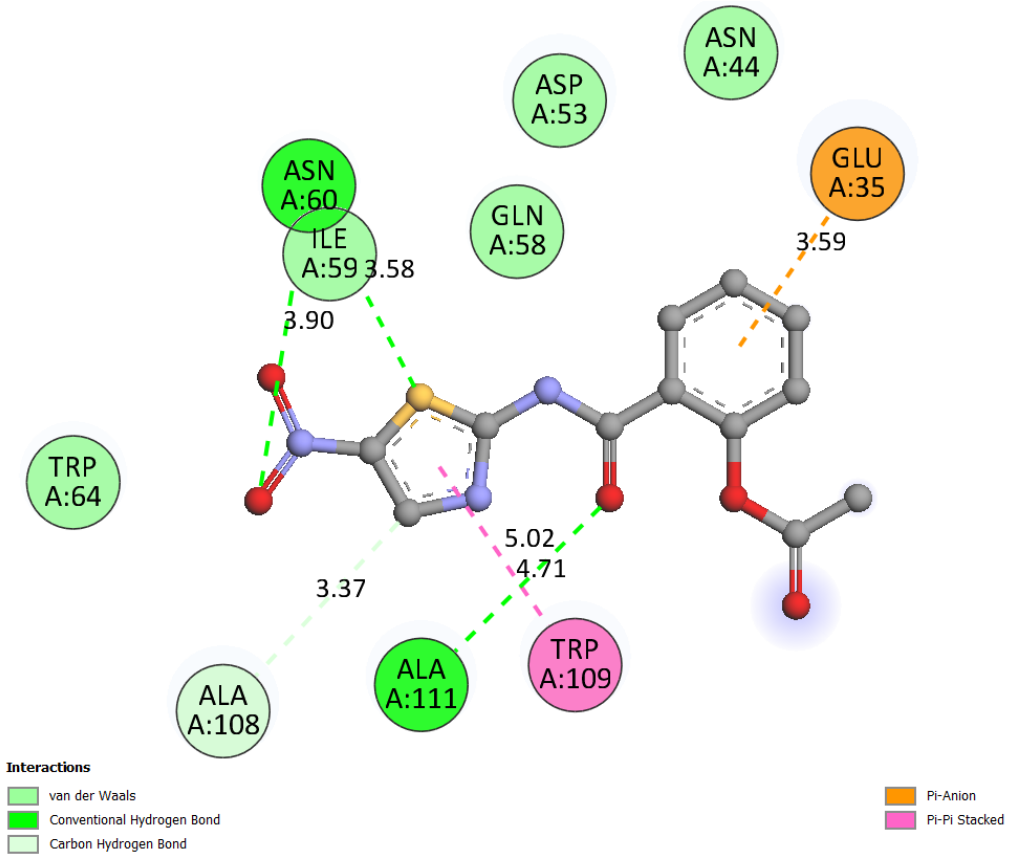
Комплекс 1 Комплекс 2 Комплекс 3

Рис. 2.6 Візуалізація комплексів лізоцим-нітазоксанід з програми PatchDock за допомогою UCSF Chimera.

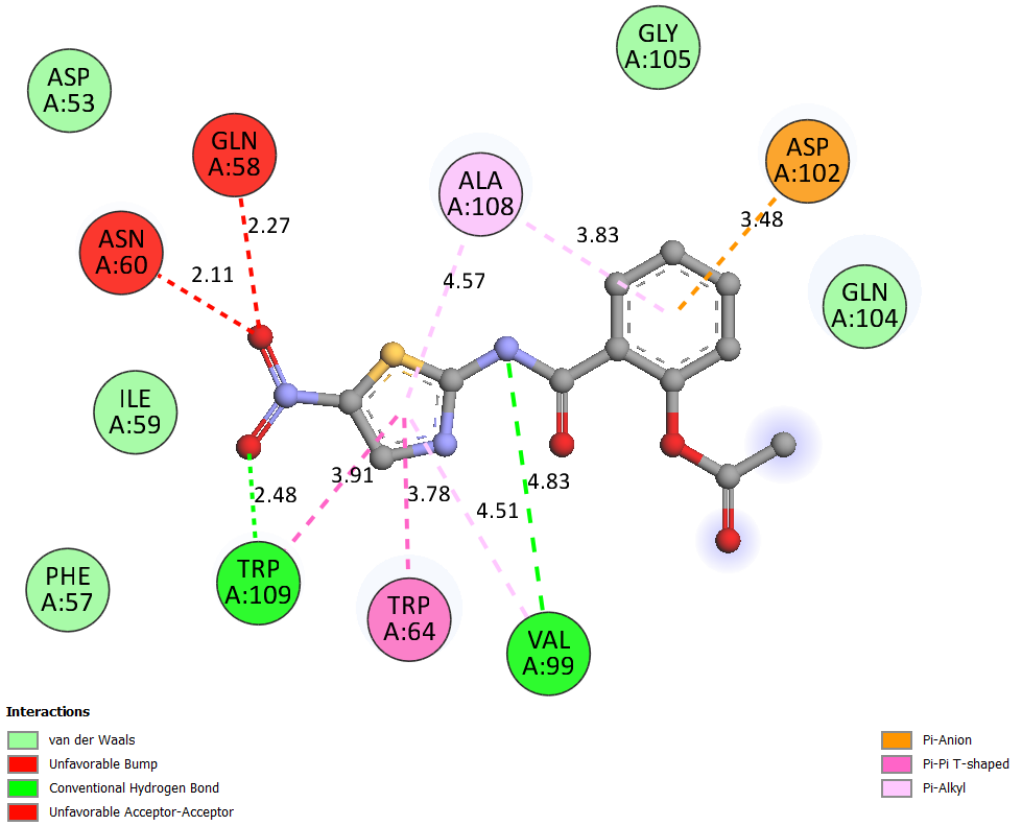
Як видно з рис. 2.6 нітазоксанід знову розміщений у такій же комірці, як і результати з SwissDock, проте типи взаємодій та взаємодіючі амінокислотні різняться.

В аналізі зв'язування нітазоксаніду з лізоцимом, проведеному у Discovery Studio (рис. 2.7), ми спостерігаємо безліч взаємодій, які сприяють стабільності та специфічності ліганд-білкового комплексу. TRP:64, ASP:53, ASN:44 та GLN:58 беруть участь у взаємодіях ван-дер-ваальса, які є слабкими силами загальної стабільності комплексу. ALA:111 і ASN:60 утворюють

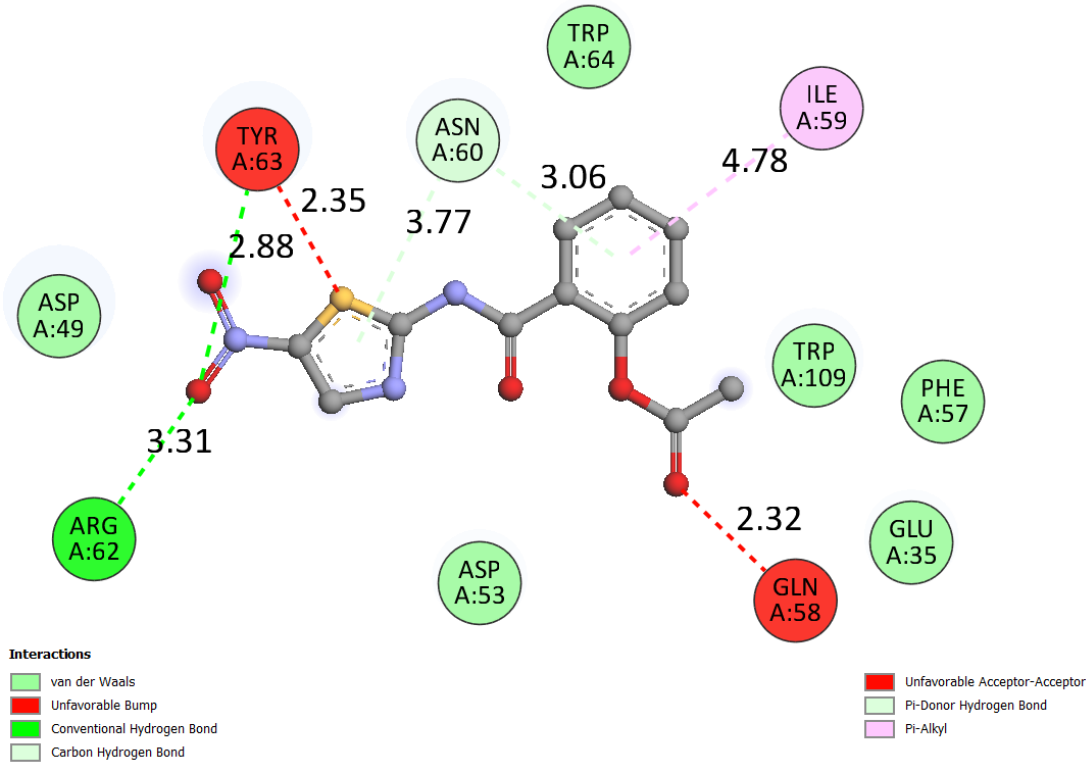
водневі звязки – більш міцні та специфічні для точної орієнтації нітазоксаніду всередині місця зв’язування. ALA:108 та ILE:59 утворюють вуглець-водневі зв’язки — менш поширені, але значні взаємодії, що підвищує спорідненість зв’язування. Взаємодії Pi-Anion з GLU:35 та багаторівневі взаємодії Pi-Pi stacked з TRP:109 вказують на ключову роль ароматичних кілець у процесі зв’язування, що забезпечує стабільність і специфічність.



Комплекс 1



Комплекс 2



Комплекс 3

Рис. 2.7 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів PatchDock лізоцим-нітазоксанід з у програмі BIOVIA Discovery Studio

Результати PLIP (рис. 2.8) мають як спільні, так і деякі відмінні риси. Наприклад, гідрофобні взаємодії, ASN:44, ASP:53 і GLN:58 в PLIP, збігаються із взаємодіями ван-дер-ваальса в DS, вказуючи на те, що ці залишки сприяють створенню неполярного середовища, що сприяє зв'язуванню ліганду. Однак ALA:111, який утворює водневий зв'язок у DS, бере участь у гідрофобних взаємодіях у PLIP, що вказує на подвійну роль як у гідрофобному ядрі, так і у специфічних взаємодіях.

Взаємодії Pi-stacking за участю TRP:64 та TRP:109 особливо цікаві, оскільки вони відповідають взаємодіям Pi-Pi stacked з TRP:109 у DS. Така відповідність підкреслює важливість TRP:109 у зв'язуванні нітазоксаніду, що, ймовірно, робить значний внесок у правильну орієнтацію та стабільність ліганду всередині сайту зв'язування.

Для ASN:60 обидва аналізи показують водневі зв'язків, хоча типи зв'язків різняться. У DS ASN:60 входить до складу звичайних та вуглецево-водневих зв'язків, а в PLIP бере участь у гідрофобних взаємодіях та водневих зв'язках. ASN:60 є універсальним залишком, який може брати участь у багатьох типах взаємодій, що робить його ключовим гравцем у зв'язуванні нітазоксаніду з лізоцимом.

Взаємодії unfavorable bump та зіткнення акцептор-акцептор, зазначені в DS, не відображаються в результатах PLIP. Ці взаємодії можуть вказувати на області, де ліганд і білок не можуть бути оптимально вирівняні, що потенційно впливає на афінність і специфічність зв'язування.

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	44A	ASN	3.54	1044	353
2	53A	ASP	3.49	1043	422
3	58A	GLN	3.59	1044	466
4	58A	GLN	3.29	1043	465
5	111A	ALA	3.42	1049	866

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	53A	ASP	3.12	3.72	120.52	×	✓	1036 [Nam]	424 [O3]

Комплекс 1

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	64A	TRP	3.64	1041	526
2	99A	VAL	3.76	1043	769
3	102A	ASP	2.76	1045	793
4	104A	GLN	3.04	1045	808
5	108A	ALA	2.97	1043	840

π-Stacking

Index	Residue	AA	Distance	Angle	Offset	Stacking Type	Ligand Atoms
1	64A	TRP	3.78	69.98	0.79	T	1030, 1031, 1032, 1033, 1034
2	109A	TRP	4.50	67.72	1.41	T	1030, 1031, 1032, 1033, 1034

Комплекс 2

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	59A	ILE	3.55	1044	475
2	59A	ILE	3.46	1045	476
3	60A	ASN	2.84	1043	482
4	64A	TRP	3.73	1044	520
5	109A	TRP	3.66	1045	852

Hydrogen Bonds

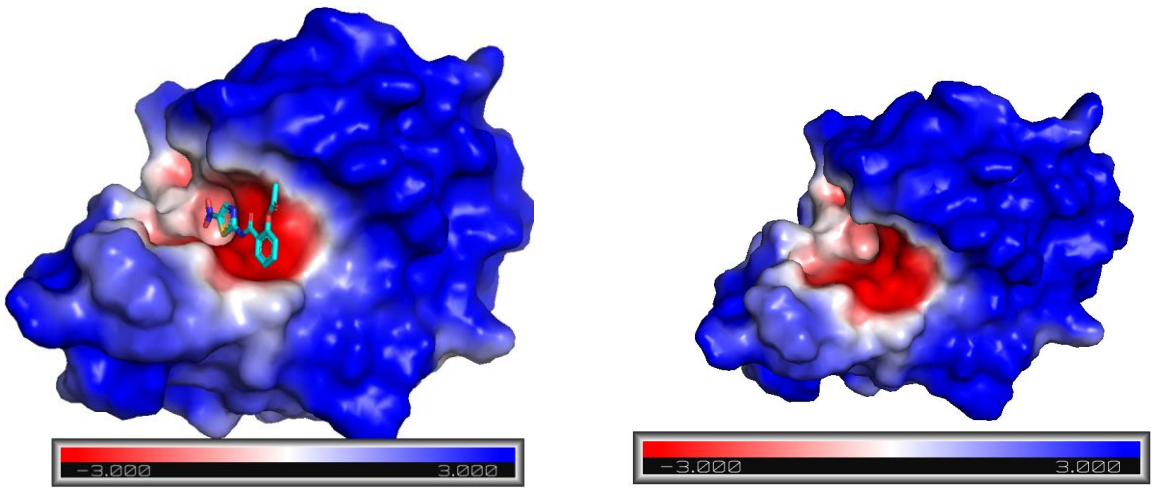
Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	60A	ASN	3.56	3.93	104.87	✓	✓	485 [Nam]	1040 [O2]

Комплекс 3

Рис. 2.8 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів PatchDock лізоцим-нітазоксанід з у програмі PLIP

Таким чином, DS-аналіз дає докладну картину взаємодій всередині комплексу нітазоксанід-лізоцим, підкреслюючи роль різних залишків у підтримці стабільності та специфічності. Порівняння з результатами PLIP показує загальне узгодження участі ключових залишків, хоча типи виявлених взаємодій можуть відрізнятися. Це порівняння ілюструє взаємодоповнюючий механізм двох програмних інструментів, кожен з яких дає унікальне уявлення про складну взаємодію сил у комплексі ліганд-білок.

Як видно з рис. 2.9, за результатами PatchDock сайт зв’язування також має здебільшого негативний потенціал, проте, на відміну від SwissDock, взаємодія не змінює потенціал. Насправді PatchDock не враховує можливі структурні зміни ліганду під час зв’язування, тому не відображає змін електростатичного потенціалу.



А Б

Рис. 2.9 Електростатичний потенціал на поверхні комплексу лізоцим-нітазоксанід з програми PatchDock (А) та чистого білка (Б).

2.1.3 Висновки

На основі аналізу кластерів SwissDock і PatchDock можна виділити кілька спільних і відмінних моментів у взаємодії нітазоксаніду з лізоцимом.

Як SwissDock, так і PatchDock вказують на сильну специфічність нітазоксаніду до взаємодії з GLU:35 – основним залишком активного центру лізоциму. Це стале спостереження підкреслює потенціал нітазоксаніду безпосередньо модулювати ферментативну активність лізоциму.

Крім того, обидва методи вказують на близькість ліганду до ASP:53. Хоча це не є прямою взаємодією з основними каталітичними залишками, така близькість вказує на потенційні непрямі ефекти або втручання в доступ до субстрату.

Обидва інструменти ідентифікують широкий спектр взаємодій, включаючи ван-дер-ваальсові, Pi-Anion, Pi-Alkyl, звичайні водневі зв'язки та інші. Такі різноманітні взаємодії, ймовірно, сприяють стабільності зв'язування нітазоксаніду з лізоцимом.

Однак, існують відмінності в описаних взаємодіях: SwissDock акцентує на таких взаємодіях, як Pi-Pi stacking, а PatchDock – на Pi-Sulfur. Ця розбіжність може виникнути через різні алгоритми та параметри, що використовуються сервісами.

Специфічні залишки ALA:108, TRP:109, GLN:58 та VAL:110 значущі та відіграють роль у гідрофобних взаємодіях та водневих зв'язках, сприяючи стабільності ліганду на сайті зв'язування. Виявлення TRP:109 як за допомогою SwissDock, так і PatchDock у різних взаємодіях, підкреслює його важливість для орієнтації та стабільності ліганда.

Аналіз також виявив універсальність ASN:60: бере участь у водневих зв'язках та гідрофобних взаємодіях. Наявність несприятливих взаємодій, таких як удари та зіткнення акцептор-акцептор, зазначені у Discovery Studio, можуть вказувати на неоптимальне вирівнювання, яке може бути уточнене у майбутніх дослідженнях стикування.

Повторюване зв'язування нітазоксаніду з активним центром лізоциму або поблизу нього, що спостерігається як у SwissDock, так і в PatchDock, вказує на його потенційну роль як інгібітора лізоциму. Враховуючи життєво важливу роль лізоциму в деградації клітинної стінки бактерій, це може

означати потенційні нецільові ефекти нітазоксаніду, особливо в терапевтичному контексті.

Збіг результатів PatchDock та SwissDock, особливо при взаємодії на сайті зв’язування, підвищує довіру до цих висновків. Однак тонкі відмінності, головним чином у типі взаємодій і специфічних залишків, ілюструють важливість застосування декількох обчислювальних методів для всебічного розуміння.

Узагальнену інформацію про взаємодії представлено у таблицях 2.1 та 2.2.

Таблиця 2.1 Аналіз комплексу лізоцим-нітозаксонід, розрахованому у SwissDock

	Комплекс 1	Комплекс 2	Комплекс 3
Сайт зв’язування	ALA:108, TRP:109, GLN:58, GLU:35	VAL:110, ARG:113, GLN:104, TYR:63, ASP:53, ASN:46, GLN:58, TRP:109, ILE:59, VAL:99, TRP:64	ALA:108, TYR:63, TRP:109, ASN:60
Типи зав’язків	Pi-Alkyl, Pi-Sulfur, Pi-Anion, Sulfur-X, Conventional Hydrogen Bond, van der Waals	van der Waals, Conventional Hydrogen Bonds	Pi-Alkyl, Pi-Pi Stacked, Metal-Acceptor, Conventional Hydrogen Bond, van der Waals
Взаємодія з активним центром та	Пряма взаємодія з GLU:35	Взаємодії поблизу ASP:53, потенційний вплив	Відсутність прямої взаємодії з каталітичними

біологічні наслідки	вказує на потенційний вплив на активність ферменту.	на доступ до субстрату або опосередкований вплив на активність ферменту.	залишками, але потенційний вплив на зв’язування субстрату або ферментативну активність лізоциму через близькість до активного центру.

Таблиця 2.2 Аналіз комплексу лізоцим-нітозаксонід, розрахованому у PatchDock

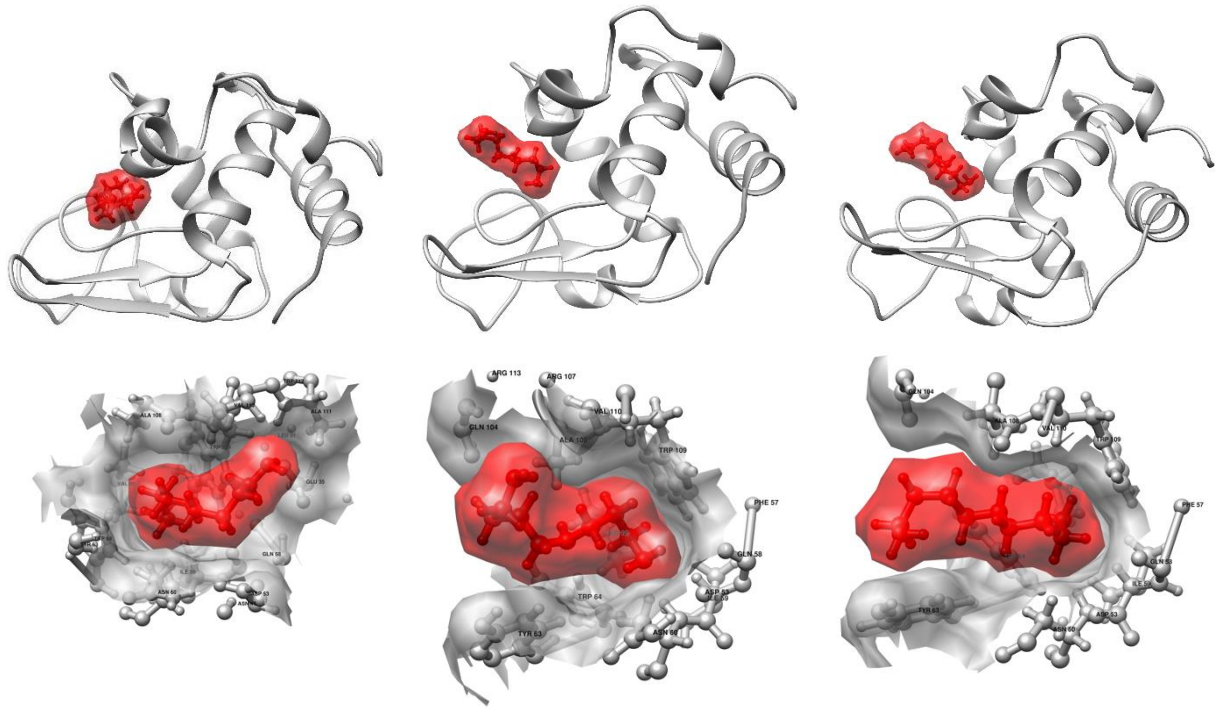
	Комплекс 1	Комплекс 2	Комплекс 3
Сайт зв’язування	TRP:64, ASP:53, ASN:44, GLN:58, ALA:111, ASN:60, ALA:108, ILE:59, GLU:35, TRP:109	ALA:108, TRP:64, TRP:109, ASP:102, TRP:109, VAL:99, PHE:57, ILE:59, GLN:104, ASP:53, GLY:105, ASN:60, GLN:58	ILE:59, ASN:60, ARG:62, TYR:63, ASP:49, ASP:53, GLU:35, TRP:109, PHE:57, TRP:64
Типи зав’язків	van der Waals, Conventional Hydrogen Bond, Carbon Hydrogen Bond, Pi-Anion, Pi-Pi Stacking	Pi-Alkyl, Pi-Pi T-shaped, Pi-Anion, Conventional Hydrogen Bond, van der Waals, Bump, Acceptor-Acceptor	Pi-Alkyl, Pi-Donor Hydrogen Bond, Carbon Hydrogen Bond, Conventional Hydrogen Bond, van der Waals, Unfavorable interactions
Взаємодія з активним	Пряма взаємодія з GLU:35 через	Близькість до ASP:53 вказує на	Взаємодія з GLU:35 через ван-дер-

центром та біологічні наслідки	пі-аніонну взаємодію, потенційний вплив в активність лізоциму.	вплив на активний центр або доступність субстрату.	ваальсові сили, взаємодія з сусідніми залишками, такими як ASP:53, вказує на потенційний вплив на активність лізоциму.

2.2 Лізоцим та спермідин

2.2.1 SwissDock

Спермідин розташований в рамках одної комірки для всіх трьох комплексів так само, як і нітазоксанід (рис. 2.10).



Комплекс 1 Комплекс 2 Комплекс 3

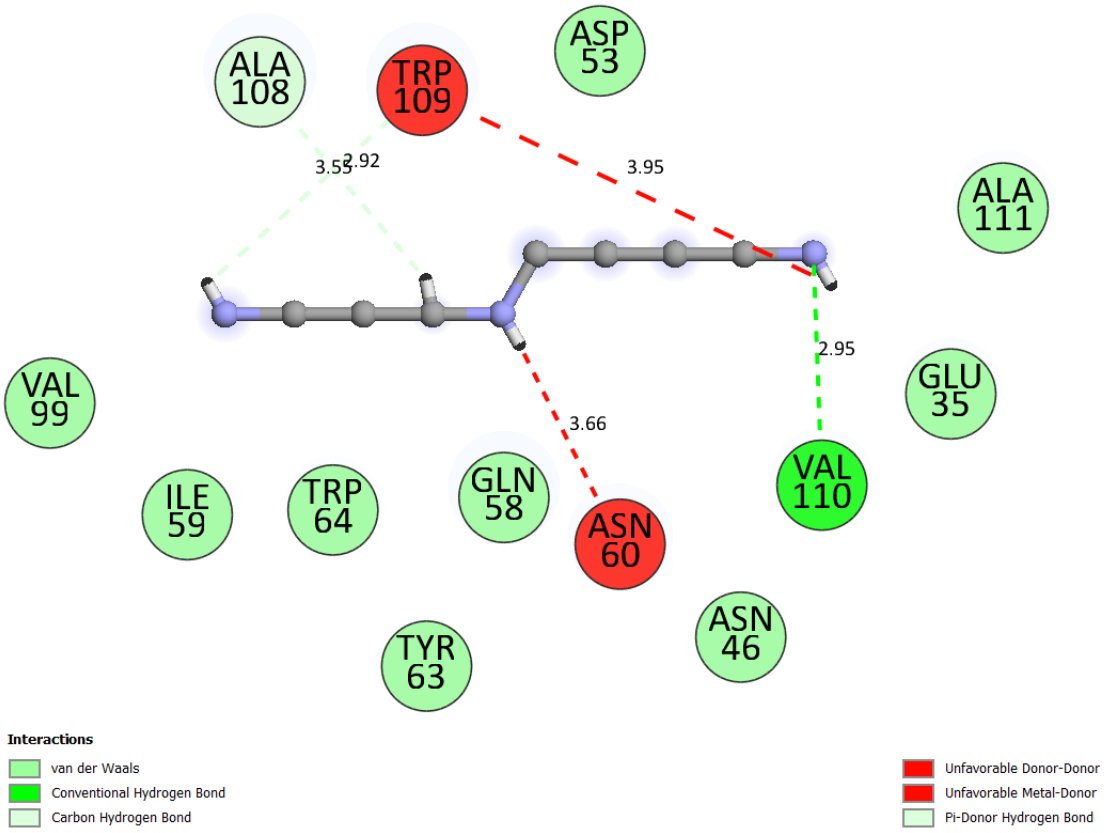
Рис. 2.10 Візуалізація комплексів лізоцим-спермідин з програми SwissDock за допомогою UCSF Chimera.

Аналіз стикування спермідину з лізоцимом, проведений за допомогою Discovery Studio та SwissDock (рис. 2.11), виявив молекулярну взаємодію, що характеризується поєднанням як стабілізуючих, і потенційно дестабілізуючих сил. Наявність несприятливих метал-донорних взаємодій, особливо з TRP:109 та ILE:59, дозволяє припустити, що може мати місце субоптимальне вирівнювання, що потенційно може вплинути на ефективність зв'язування. Донорно-донорна взаємодія за участю ASN:60 може вказувати на силу відштовхування між донорами водневих зв'язків та потенційне зниження стабільності ліганд-білкового комплексу.

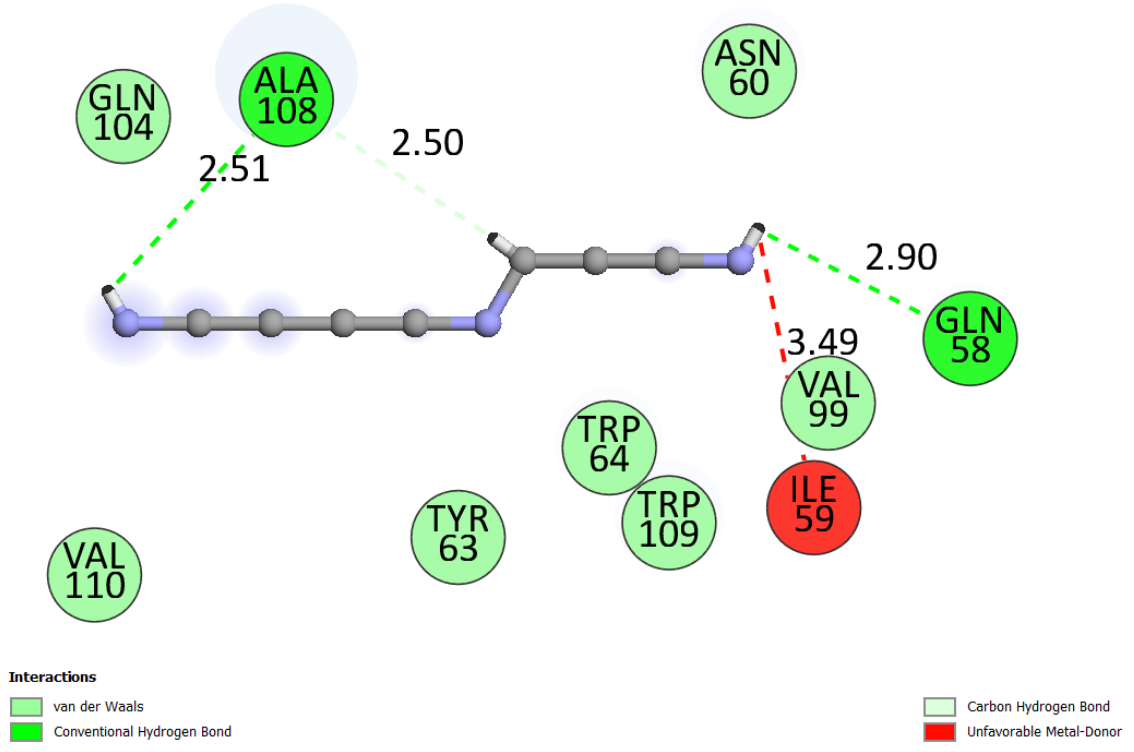
Незважаючи на несприятливі взаємодії, комплекс також стабілізується декількома вуглецево-водневими зв'язками, ALA:108 і TRP:109. Звичайні водневі зв'язки, особливо з VAL:110, ALA:108 і GLN:58, вказують на сильні та специфічні взаємодії, які мають вирішальне значення для точної орієнтації та закріплення спермідину всередині кишені.

Аналіз також підкреслює безліч взаємодій ван-дер-ваальса у всіх кластерах. Це додатково доповнюється Pi-Donor водневими зв'язками в третьому кластері з TRP:109 і GLN:58, що підкреслюють роль ароматичних взаємодій у підвищенні афінності зв'язування за допомогою механізмів укладання ароматичних кілець.

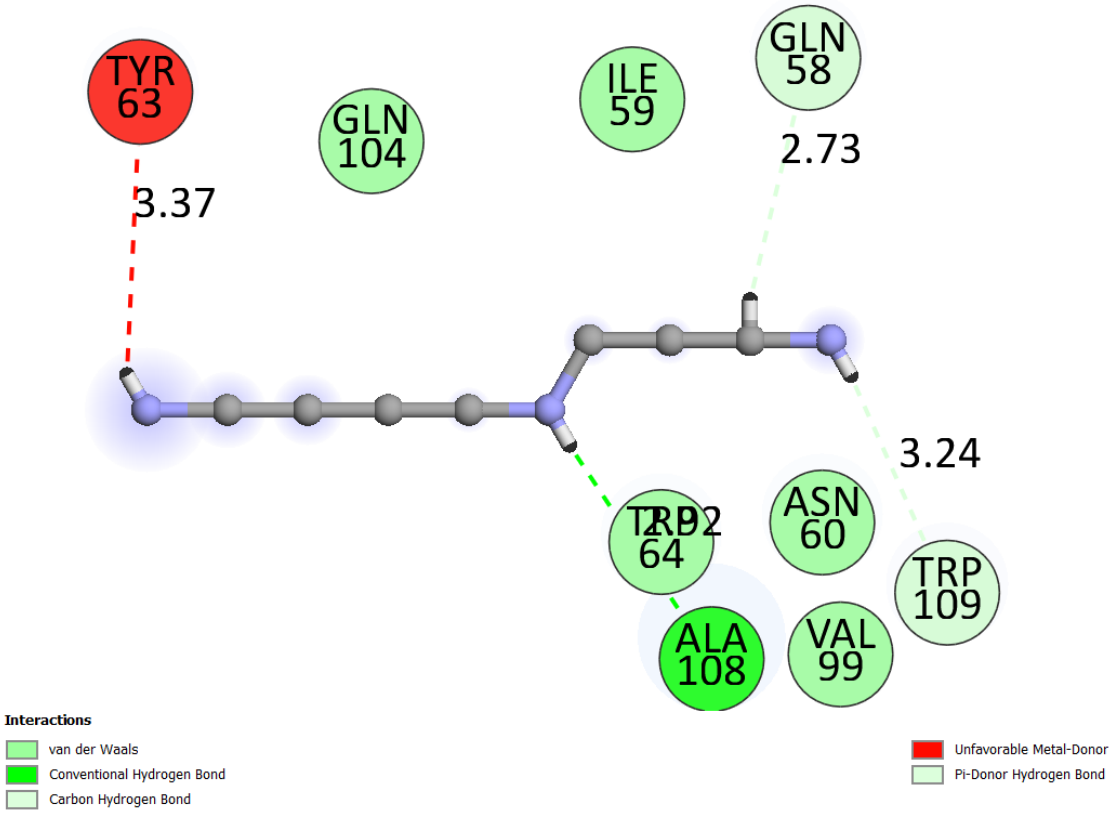
В цілому, поєднання цих взаємодій означає, що поточний режим зв'язування забезпечує баланс сил, які сприяють стабільності та специфічності взаємодії спермідину з лізоцимом. Детальне дослідження цих взаємодій дає цінне розуміння динаміки зв'язування і визначення потенційних модифікацій для підвищення ефективності ліганда.



Комплекс 1



Комплекс 2



Комплекс 3

Рис. 2.11 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів SwissDock лізоцим-спермідин з у програмі BIOVIA Discovery Studio

PLIP-аналіз взаємодії спермідину з лізоцимом в основному дає водневі зв'язки між лігандом і конкретними амінокислотами. GLU:35, VAL:110 та ALA:111 беруть участь в утворенні водневих зв'язків – сильні та специфічні взаємодії. Ці взаємодії роблять значний внесок у стабільність та специфічність ліганд-білкового комплексу, вони необхідні для правильного позиціонування спермідину.

Взаємодії з GLN:58, ASN:60 та ALA:108 відіграють роль у підтримці структурної цілісності ліганд-білкового комплексу, причому ASN:60 потенційно відіграє центральну роль через його часту участь у різних кластерах. ALA:108 також є ключовим залишком, що бере участь у утворенні водневих зв'язків у кількох кластерах.

У цілому, аналіз PLIP (рис. 2.12) дає картину міцних зав'язків, в якій водневі зв'язки вирішальні. Поряд з гідрофобними ці взаємодії створюють

міцний і специфічний сайт зв'язування, що важливо для біологічної функції комплексу. Детальне розуміння цих взаємодій цінне для молекулярної основи зв'язування спермідину та для спрямування майбутніх зусиль щодо розробки та оптимізації ліків.

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	35A	GLU	1.98	2.97	163.88	×	✓	2032 [N3]	582 [O2]
2	110A	VAL	2.95	3.46	112.69	✓	✓	1681 [Nam]	2032 [N3]
3	111A	ALA	2.36	3.32	161.06	✓	✓	1697 [Nam]	2032 [N3]

Комплекс 1

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	58A	GLN	2.90	3.76	142.00	×	✓	2023 [N3]	922 [O2]
2	60A	ASN	2.16	3.12	161.42	✓	✓	942 [Nam]	2023 [N3]
3	108A	ALA	2.51	3.49	159.26	×	✓	2032 [N3]	1656 [O2]

Комплекс 2

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	63A	TYR	3.22	3.57	103.32	✓	✓	1004 [O2]	2032 [N3]
2	63A	TYR	2.57	3.57	166.92	×	✓	2032 [N3]	1004 [O2]
3	108A	ALA	2.92	3.74	138.13	×	✓	2027 [N3]	1656 [O2]

Комплекс 3

Рис. 2.12 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів SwissDock лізоцим-спермідин з у програмі PLIP

Аналізи DS та PLIP ідентифікують ключові залишки: ALA:108, TRP:109 та ASN:60. Ці залишки беруть участь у різних типах взаємодій: водневі зв’язки та сили ван-дер-ваальса. Повторення цих залишків в обох аналізах наголошує на їх важливості в орієнтації зв’язування ліганду та загальної структурної цілісності комплексу.

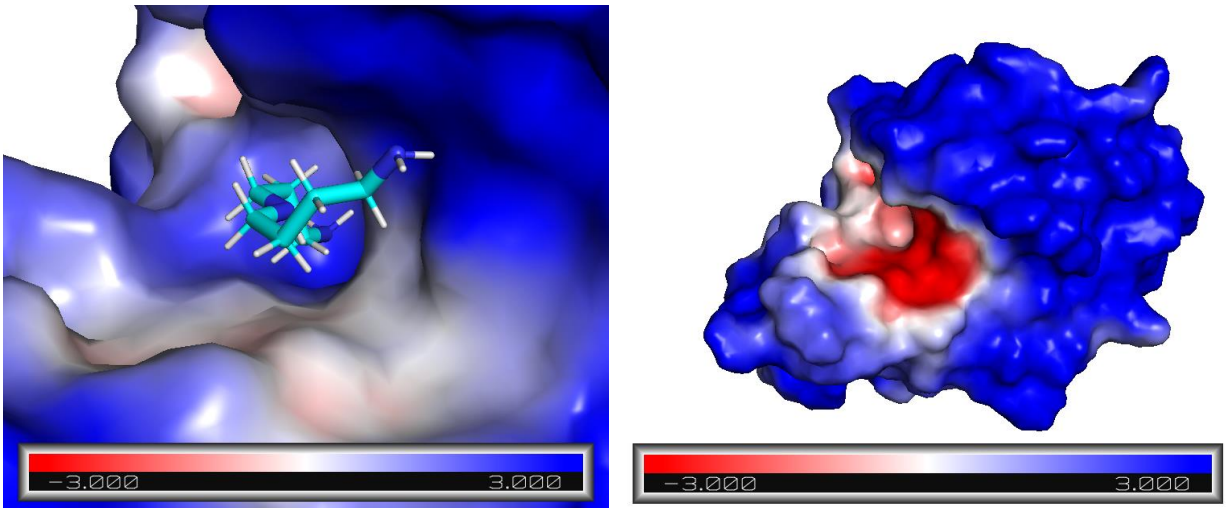
Водневий зв’язок є найпоширенішим в обох аналізах, причому як DS, так і PLIP підкреслюють його роль у забезпеченні сильних та специфічних взаємодій між спермідином та лізоцимом.

Аналіз DS вказує на наявність несприятливих взаємодій, таких як метал-донор та донор-донор, які не згадуються у результатах PLIP. Ці взаємодії можуть означати потенційні області для оптимізації зв’язування ліганда.

PLIP підкреслює роль гідрофобних взаємодій та Pi-stacking, які не настільки помітні в аналізі DS. Ці взаємодії необхідні для правильного позиціонування ліганду та сприяють спорідненості зв’язування за рахунок неполярних контактів та укладання ароматичних кілець.

Аналіз DS дає більш повний опис типів зв’язків, включаючи вуглець-водневі та Pi-Donor, які не так чітко розмежовані в результатах PLIP. Ці взаємодії слабші, ніж звичайні водневі зв’язки, але відіграють роль у загальному ssв’язку.

Існує загальний консенсус щодо участі ключових залишків та важливості водневих зв’язків, аналізи DS та PLIP розрізняються акцентом на певні типи взаємодій. DS підкреслює наявність як стабілізуючих, так і потенційно дестабілізуючих сил усередині комплексу, тоді як PLIP фокусується на стабілізуючих гідрофобних та Pi-stacking взаємодіях.



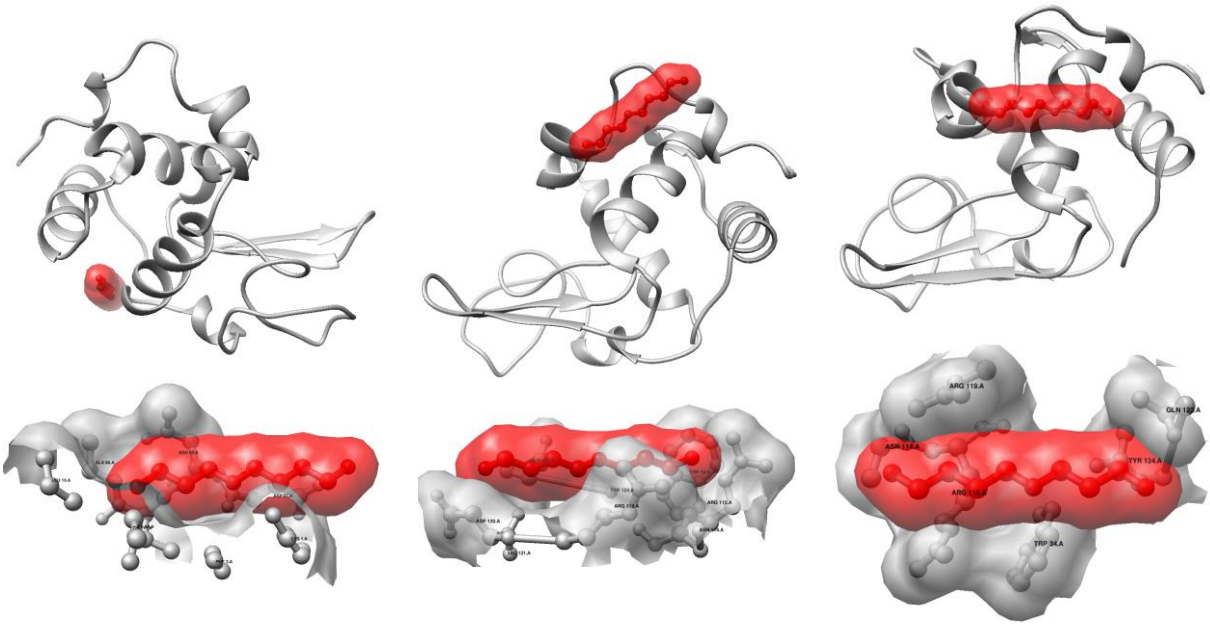
А Б

Рис. 2.13 Електростатичний потенціал на поверхні комплексу лізоцим-спермідин з програми SwissDock (А) та чистого білка (Б).

Як видно з рис. 2.13, за результатами SwissDock сайт зв’язування має негативний потенціал. Цей результат підтверджує взаємодію ліганду з полярними та зарядженими амінокислотами(ASP, GLU, ASN, GLN, TYR, ARG). Зв’язування нітазоксаніду суттєво змінює електростатичних потенціал сайту зв’язування до позитивно-нейтрального – як і для взаємодії лізоциму з нітазоксанідом завдяки зміні електростатичного потенціалу, водневих та полярних взаємодій і, ймовірно, механізму індукованого диполя.

2.2.2 PatchDock

На відміну від SwissDock, PatchDock демонструє 3 комплекси з найвищою енергією зв’язку у абсолютно інших центрах зв’язування (рис. 2.14).



Комплекс 1 Комплекс 2 Комплекс 3

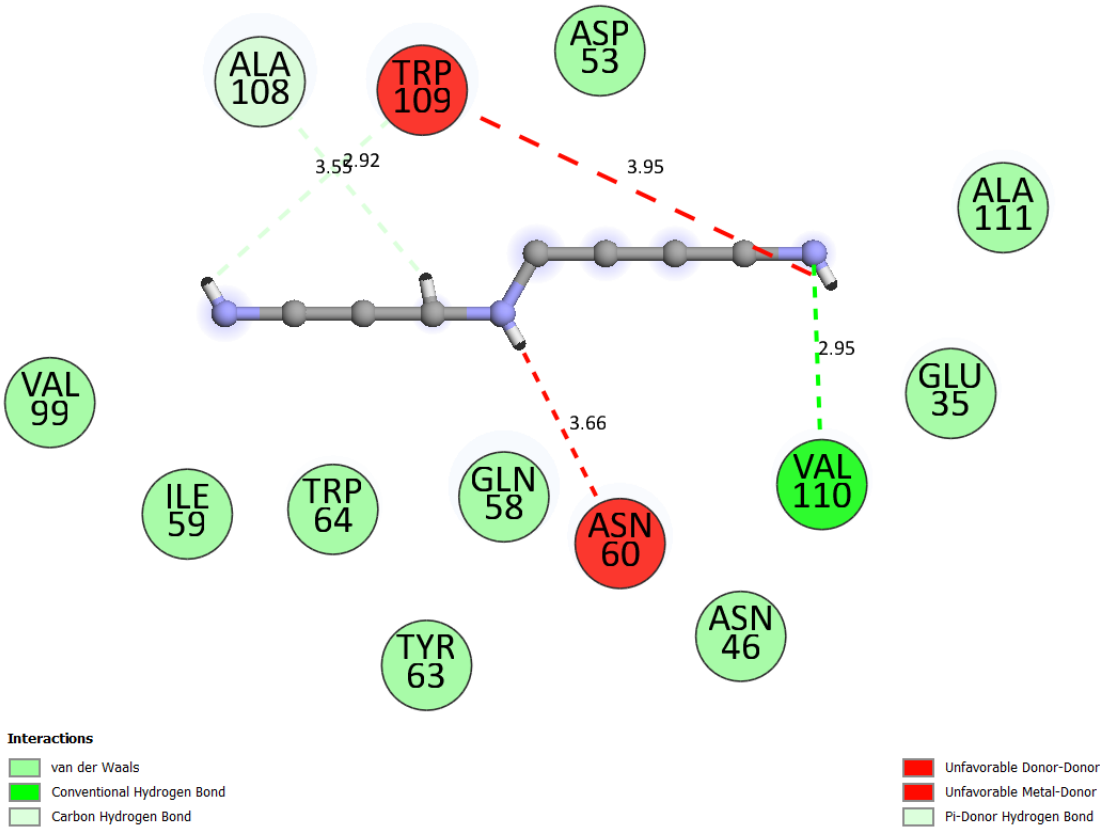
Рис. 2.14 Візуалізація комплексів лізоцим-спермідин з програми PatchDock за допомогою UCSF Chimera.

Аналіз стикування лізоциму з лізоцимом, інтерпретований за допомогою Discovery Studio (рис. 2.15), показує різноманітність сил ван-дер-ваальса, звичайних водневих зв’язків та вуглець-водневих зв’язків, що в сукупності сприяють стабільності та специфічності ліганд-білкового комплексу.

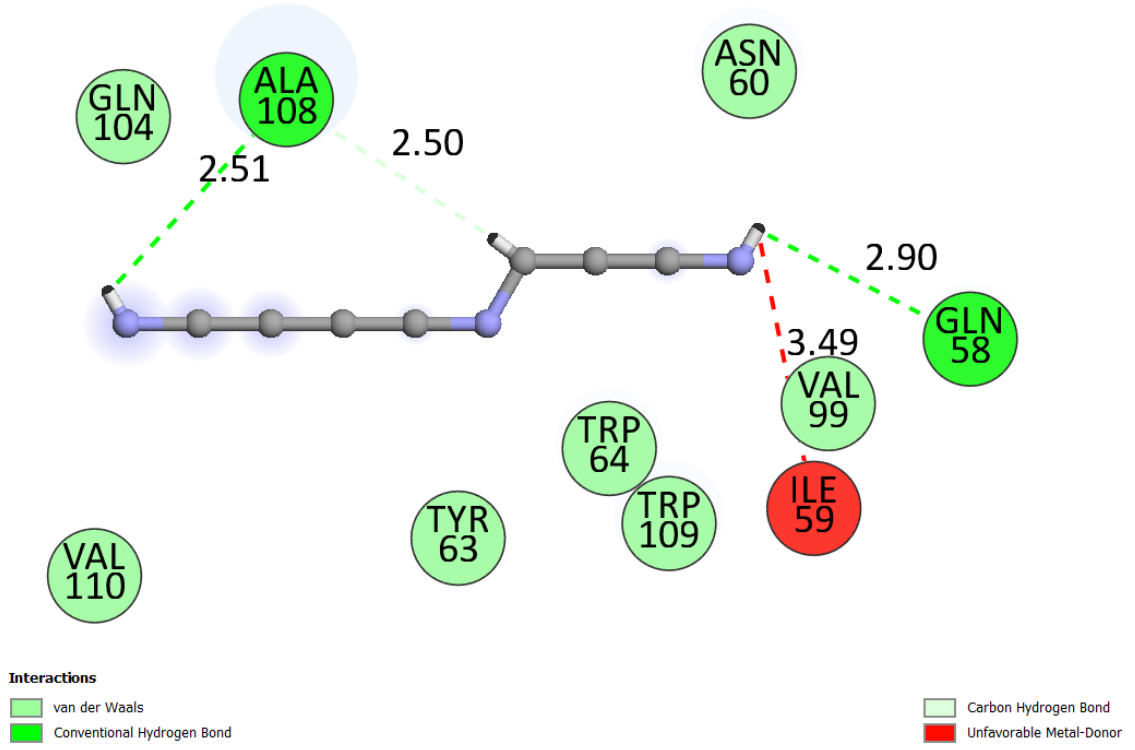
Взаємодії ван-дер-ваальса переважають у всьому профілі з різними залишками: LEU:15, THR:11, ILE:89, ALA:90, PHE:3, ASN:88, ASP:87, TRP:34, ARG:119, GLN:123 та ASP:120. Ці взаємодії мають основне значення для закріплення ліганду у гідрофобних кишенях білка. Звичайні водневі зв’язки, особливо з LYS:1 і ARG:115, свідчать про високоспецифічні взаємодії, які підвищують точність зв’язування та сприяють оптимальній орієнтації ліганду всередині сайту зв’язування.

Вуглець-водневі зв’язки теж відіграють допоміжну роль у зміцненні комплексу ліганд-білок. Участь ARG:115 як у водневих, так і вуглецевих зв’язках у різних кластерах вказує на його значну роль у процесі зв’язування.

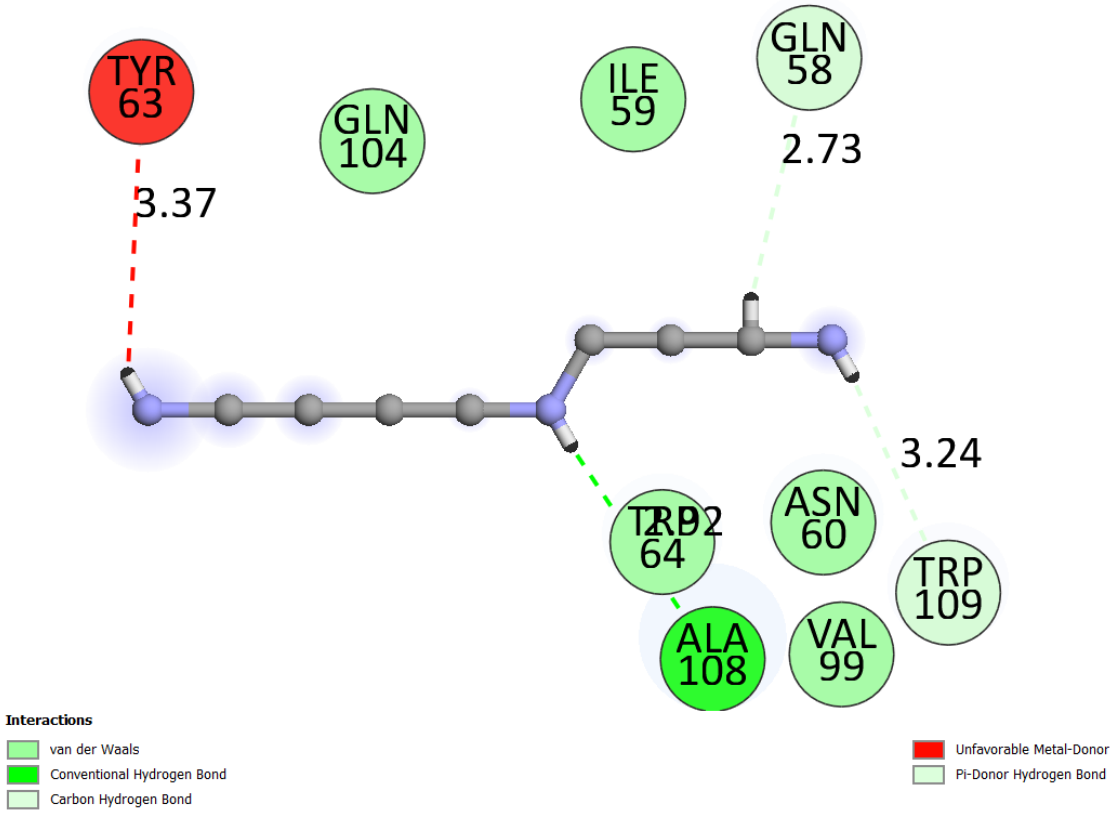
ARG:115 у цих взаємодіях підкреслює його потенціал як ключового фактора, що визначає афінність та специфічність зв’язування.



Комплекс 1



Комплекс 2



Комплекс 3

Рис. 2.15 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів PatchDock лізоцим-спермідин з у програмі BIOVIA Discovery Studio

Аналіз PLIP (рис. 2.16) доповнює ці результати та показує ключові водневі зв'язки за участю LYS:1, ARG:115, ASN:114 та TYR:124, які необхідні для структурної цілісності та стабільності ліганд-білкового комплексу. Гідрофобні взаємодії, особливо з ILE:89 і PHE:3, збігаються з взаємодіями ван-дер-ваальса, виявленими DS.

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	1A	LYS	2.78	1036	7
2	3A	PHE	3.82	1032	27
3	87A	ASP	3.07	1037	683
4	89A	ILE	3.89	1032	701

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	1A	LYS	2.75	3.44	124.86	✓	✓	9 [N3]	1034 [N3]
2	1A	LYS	2.74	3.44	125.85	×	✓	1034 [N3]	9 [N3]
3	89A	ILE	2.55	3.33	136.71	✓	×	695 [Nam]	1030 [N3]

Комплекс 1

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	115A	ARG	3.88	1032	904
2	120A	ASP	3.98	1037	949

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	115A	ARG	2.09	2.71	118.77	✓	✓	910 [Ng+]	1030 [N3]
2	115A	ARG	1.52	2.51	160.86	×	✓	1030 [N3]	907 [Ng+]
3	119A	ARG	2.63	3.28	123.67	✓	✓	943 [Ng+]	1034 [N3]
4	120A	ASP	3.13	3.97	141.04	×	✓	1039 [N3]	951 [O3]
5	123A	GLN	3.22	3.61	105.43	✓	✓	979 [Nam]	1039 [N3]

Комплекс 2

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	115A	ARG	2.95	1037	904

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	114A	ASN	2.22	2.95	127.60	×	×	1039 [N3]	895 [O2]
2	123A	GLN	1.92	2.61	122.35	×	✓	1030 [N3]	978 [O2]
3	124A	TYR	3.56	4.02	112.95	✓	✓	991 [O3]	1034 [N3]

Комплекс 3

Рис. 2.16 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів PatchDock лізоцим-спермідин з у програмі PLIP

Таким чином, аналізи як DS, так і PLIP підкреслюють значення ARG:115 у зв'язуванні спермідину з лізоцимом, особливо за рахунок водневих зв'язків. У сукупності ці аналізи дають повну картину діючих молекулярних взаємодій, що має значне значення для визначення майбутніх стратегій розробки та оптимізації ліків.

2.2.3 Висновки

Залишки ALA:108, TRP:109, ASN:60, LYS:1, ARG:115, ASN:114 та TYR:124 є головними для зв'язування спермідину завдяки утворенню водневих зв'язків та сил ван-дер-ваальса.

Виявлено спектр типів взаємодії, включаючи ван-дер-ваальсови, звичайні водневі, вуглець-водневі зв'язки та Pi-взаємодії. Різноманітність передбачає множинні способи зв'язування та орієнтації спермідину на поверхні лізоциму.

Водневий зв'язок виступає як домінуюча сила в аналізах SwissDock і PatchDock. Наявність гідрофобних взаємодій та Pi-стекінгу, особливо у результатах PLIP, підкреслює їх роль у позиціонуванні лігандів та афінності зв'язування.

Пряма взаємодія з GLU:35 та близькість до ASP:53 спостерігаються у кількох комплексах (навіть при унікальній орієнтації спермідину на поверхні лізоциму за результатами PatchDock). Це вказує на потенційний прямий та/або опосередкований вплив на активний центр лізоциму. Тобто, спермідин може модулювати ферментативну активність лізоциму як за допомогою конкурентних, так і алостеричних механізмів. Це може мати наслідки для імунної відповіді та інших фізіологічних процесів, у яких відіграє роль лізоцим.

Для підтвердження цих обчислювальних прогнозів потрібна експериментальна перевірка. Такі дослідження можуть включати ферментативні аналізи, структурні дослідження для визначення точного способу зв'язування та дослідження *in vivo* для вивчення фізіологічної значущості цієї взаємодії.

Проте результати комп'ютерного докінгу є переконливим аргументом для подальшого дослідження. Потенційна модуляція лізоциму спермідином відкриває нові можливості для розуміння біологічної ролі цих молекул та їх значення для здоров'я та хвороб.

Узагальнену інформацію про взаємодії представлено у таблицях 2.3 та 2.4.

Таблиця 2.3 Аналіз комплексу лізоцим-спермідин, розрахованому у SwissDock

	Комплекс 1	Комплекс 2	Комплекс 3
Сайт зв'язування	TRP:64, ASP:53, ASN:44, GLN:58, ALA:111, ASN:60, ALA:108, ILE:59, GLU:35,	ALA:108, TRP:64, TRP:109, ASP:102, TRP:109, VAL:99, PHE:57, ILE:59,	ILE:59, ASN:60, ARG:62, TYR:63, ASP:49, ASP:53, GLU:35, TRP:109, PHE:57, TRP:64

	TRP:109	GLN:104, ASP:53, GLY:105, ASN:60, GLN:58	
Типи зав’язків	van der Waals, Conventional Hydrogen Bond, Carbon Hydrogen Bond, Pi-Anion, Pi-Pi Stacking	Pi-Alkyl, Pi-Pi T-shaped, Pi-Anion, Conventional Hydrogen Bond, van der Waals, Bump, Acceptor-Acceptor	Pi-Alkyl, Pi-Donor Hydrogen Bond, Carbon Hydrogen Bond, Conventional Hydrogen Bond, van der Waals, Unfavorable interactions
Взаємодія з активним центром та біологічні наслідки	Пряма взаємодія з GLU:35 через пі-аніонні зв’язки, потенційна модуляція активність лізоциму.	Вплив на активний центр або доступність субстрату через близькість до ASP:53.	Взаємодія з GLU:35 через ван-дер-ваальсові сили, взаємодія з сусідніми залишками, такими як ASP:53, що передбачає непрямий вплив на активність.

Таблиця 2.4 Аналіз комплексу лізоцим-спермідин, розрахованому у PatchDock

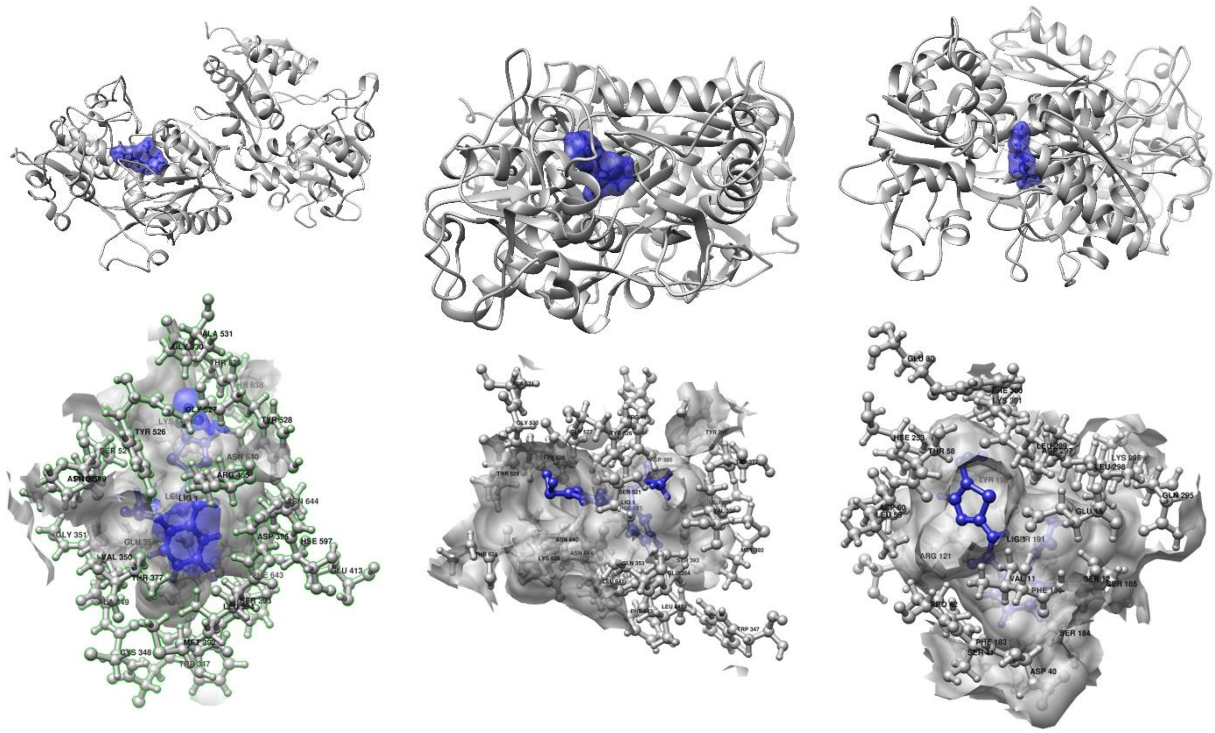
	Комплекс 1	Комплекс 2	Комплекс 3
Сайт зв’язування	TRP:64, ASP:53, ASN:44, GLN:58, ALA:111, ASN:60, ALA:108, ILE:59, GLU:35, TRP:109	ALA:108, TRP:64, TRP:109, ASP:102, TRP:109, VAL:99, PHE:57, ILE:59, GLN:104, ASP:53, GLY:105, ASN:60, GLN:58	ILE:59, ASN:60, ARG:62, TYR:63, ASP:49, ASP:53, GLU:35, TRP:109, PHE:57, TRP:64
Типи зав’язків	van der Waals, Conventional Hydrogen Bond, Carbon Hydrogen Bond, Pi-Anion, Pi-Pi Stacking	Pi-Alkyl, Pi-Pi T-shaped, Pi-Anion, Conventional Hydrogen Bond, van der Waals, Bump, Acceptor-Acceptor	Pi-Alkyl, Pi-Donor Hydrogen Bond, Carbon Hydrogen Bond, Conventional Hydrogen Bond, van der Waals, Unfavorable interactions
Взаємодія з активним центром та біологічні наслідки	Зв’язок з GLU:35 через пі-аніонну взаємодію, потенційний	Вплив на активний центр або доступність субстрату через близькість до	Взаємодія з GLU:35 через ван-дер-ваальсові сили, взаємцодія з

	вплив на активність лізоциму.	ASP:53.	сусідніми залишками, такими як ASP:53 має непрямий вплив на активність.

2.3 Лактоферин та нітазоксанід

2.3.1 SwissDock

Нітазоксанід має декілька різних сайтів зв’язування на лактоферині (рис. 2.17).



Комплекс 1 Комплекс 2 Комплекс 3

Рис. 2.17 Візуалізація комплексів лактоферин-нітазоксанід з програми SwissDock за допомогою UCSF Chimera.

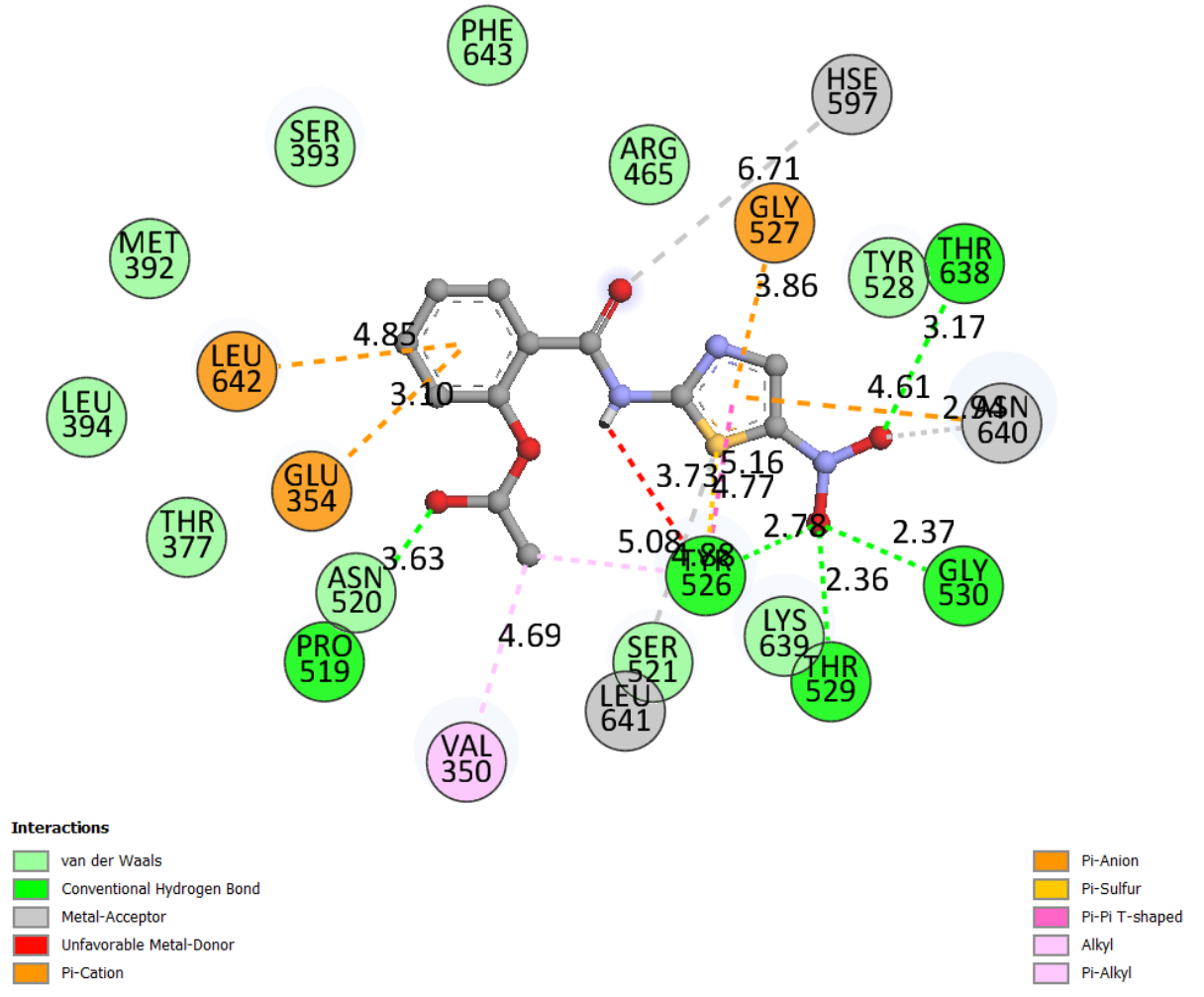
Докінг-аналіз нітазоксаніду з лактоферином за допомогою Discovery Studio (рис. 2.18), виявив різноманітні типи взаємодій між трьома окремими кластерами, які в сукупності означають потенційну стабільність комплексу ліганд-білок.

Перший комплекс характеризується різноманітним набором взаємодій: Pi-Alkyl та Alkyl забезпечують гідрофобну взаємодію, яка стабілізує ліганд у неполярному оточенні білка. Взаємодії Pi-Pi T-подібної форми та Pi-Sulfur можуть сприяти специфічності зв'язування через спрямований характер цих взаємодій. Зв'язок Pi-Anion з LEU:642, GLU:354 і ASN:640 вказує на електростатичну комплементарність між лігандом і амінокислотними залишками. Відомо, що лактоферин зв'язує іони заліза, і цілком можливо, що докінг-аналіз вказує на взаємодію ліганду із залізозв'язуючим сайтом лактоферину на прикладі взаємодії метал-акцептор з LEU:641 і ASN:640. Несприятливі взаємодії Metal-Donor з TYR:526 можуть вказувати на деяке неоптимальне зв'язування, що може стати областю оптимізації. Звичайні водневі зв'язки з PRO:519, TYR:526, THR:529 та GLY:530 вказують на сильні та специфічні взаємодії, які мають вирішальне значення для точної орієнтації та закріплення нітазоксаніду всередині кишені зв'язування. Взаємодії ван-дер-ваальса з різними залишками додатково стабілізують комплекс.

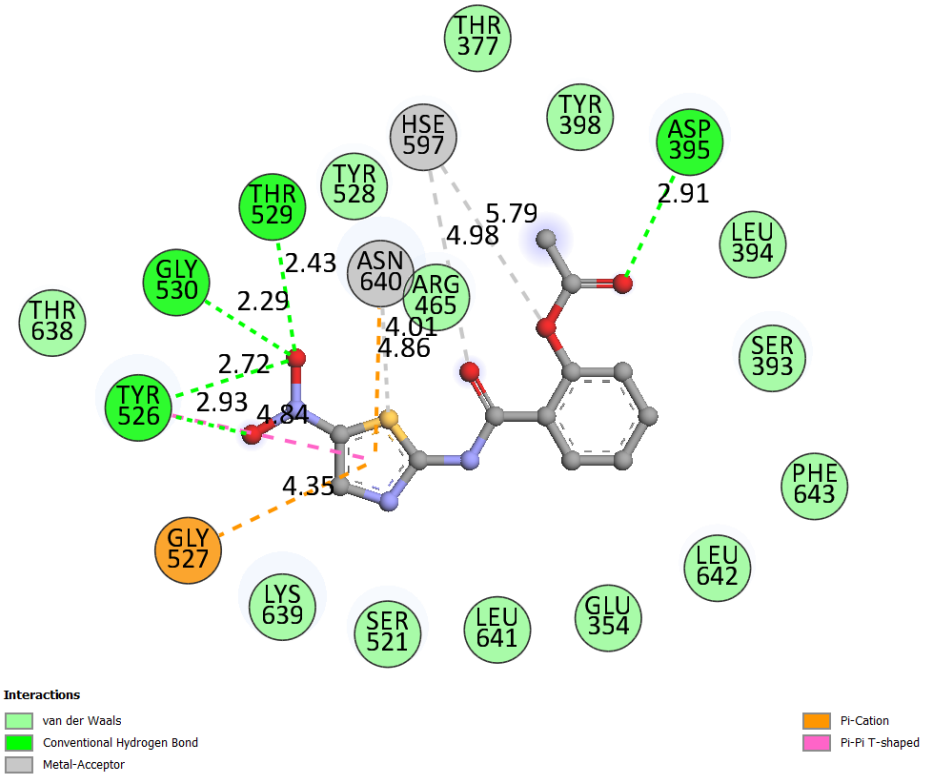
Кластер 2 має деякі спільні взаємодії з кластером 1, особливо за участю TYR:526 і ASN:640, що ще раз підкреслює їх важливість у зв'язуванні нітазоксаніду з лактоферином. Взаємодії метал-акцептор з ASN:640 та HSE:597 можуть вказувати на роль цих залишків у координації іону заліза. Звичайні водневі зв'язки з TYR:526, GLY:530 та THR:529 відповідають зв'язкам у кластері 1, що наголошує на важливості цих взаємодій. У цьому кластері також переважають взаємодії ван-дер-ваальса, тобто ці контакти послідовно сприяють стабільності комплексу різними способами зв'язування.

Кластер 3 представляє новий набір взаємодій з різними залишками: VAL:11 і PRO:42, що беруть участь у взаємодіях Pi-Alkyl, та PHE:190 у T-подібній взаємодії Pi-Pi. Ці взаємодії сприяють гідрофобній стабілізації та

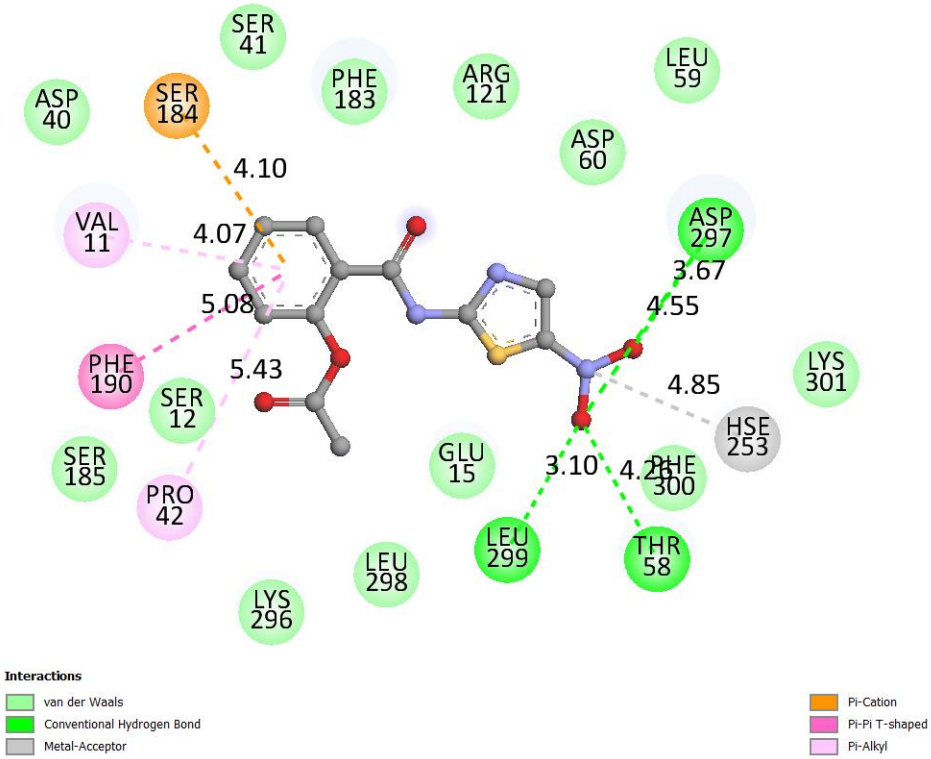
специфічності зв’язування ліганду. Взаємодія метал-акцептор із HSE:253 передбачає наявність ще одного потенційного місця координації металів. Звичайні водневі зв’язки з LEU:299, THR:58 та ASP:297 вказують на додаткові специфічні взаємодії, важливі для афінності та специфічності зв’язування. Взаємодія ван-дер-ваальса в цьому кластері включає інший набір залишків, порівняно з кластерами 1 та 2, що вказує на те, що ліганд може приймати іншу орієнтацію або положення всередині сайту зв’язування в цьому кластері.



Комплекс 1



Комплекс 2



Комплекс 3

Рис. 2.18 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів SwissDock лактоферин-нітазоксанід з у програмі BIOVIA Discovery Studio

PLIP-аналіз взаємодії між нітазоксанідом та лактоферином (рис. 2.19) показує набір нековалентних взаємодій, які сприяють афінності зв'язування та специфічності ліганд-білкового комплексу.

Для першого комплексу характерні гідрофобні взаємодії з VAL:350 у гідрофобному оточення зв'язуючої кишені, що важливо для початкового позиціонування та стабілізації ліганду. Водневі зв'язки з TYR:526 та TYR:528, а також LYS:639 мають значення для точної орієнтації та закріплення нітазоксаніду всередині центру зв'язування.

Кластер 2 показує гідрофобні зв'язки з ASP:395. Взаємодія Pi-stacking з TYR:526 підкреслює важливість ароматичних взаємодій у процесі зв'язування, які можуть значно підвищити спорідненість ліганду до білка. Крім того, сольові містки з ARG:465 передбачають наявність електростатичних взаємодій, які додатково стабілізують комплекс ліганд-білковий.

У кластері 3 гідрофобні взаємодії з VAL:11 знову визначають роль гідрофобних контактів у зв'язуванні ліганду. Водневі зв'язки з GLU:80 вказують на специфічні взаємодії, які сприяють специфічності зв'язування та правильному вирівнюванню нітазоксаніду всередині сайту зв'язування.

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	350A	VAL	3.86	10573	5424

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	526A	TYR	2.16	2.99	143.99	✓	✓	7987 [O2]	10584 [O2]
2	526A	TYR	1.84	2.78	163.71	×	✓	10578 [O3]	7994 [O2]
3	528A	TYR	3.09	4.02	155.54	✓	✓	8002 [Nam]	10565 [N2]
4	639A	LYS	2.12	2.94	141.58	×	✓	10577 [O3]	9731 [O2]

Комплекс 1

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	395A	ASP	2.91	3.69	136.03	✓	✓	6049 [Nam]	10584 [O2]

π-Stacking

Index	Residue	AA	Distance	Angle	Offset	Stacking Type	Ligand Atoms
1	526A	TYR	4.84	82.98	1.55	T	10564, 10565, 10566, 10567, 10574

Salt Bridges

Index	Residue	AA	Distance	Protein positive?	Ligand Group	Ligand Atoms
1	465A	ARG	5.33	✓	Carboxylate	10581, 10584

Комплекс 2

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	11A	VAL	3.61	10568	184

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	80A	GLU	3.17	4.09	158.52	×	✓	10578 [O3]	1260 [O2]

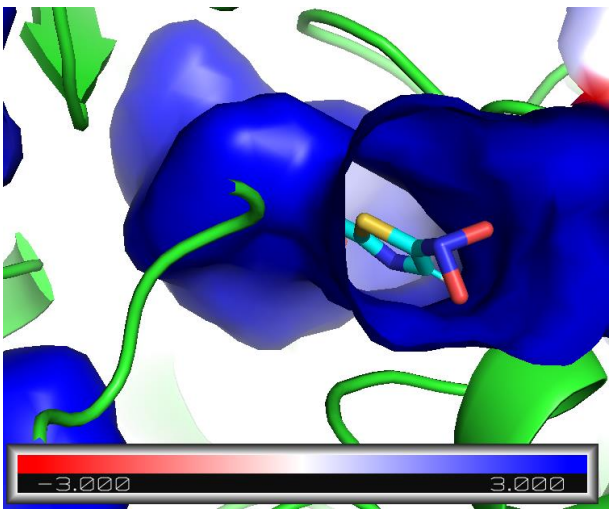
Комплекс 3

Рис. 2.19 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів SwissDock лактоферин-нітазоксанід з у програмі PLIP

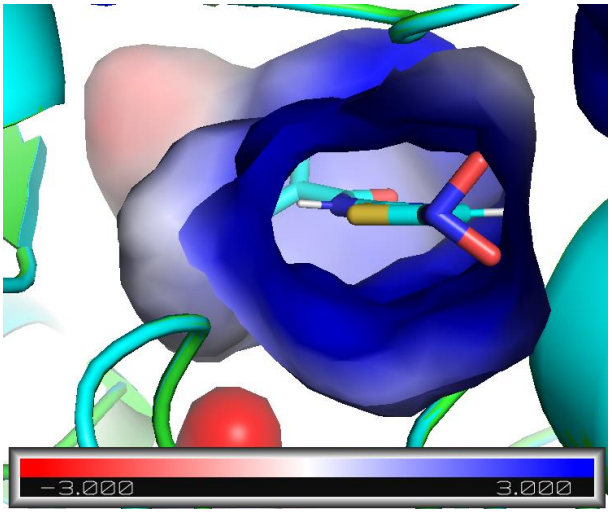
Аналізи за допомогою PLIP та DS ідентифікують ключові взаємодії, важливі для зв'язування нітазоксаніду з лактоферином. Постійно наявні гідрофобні взаємодії та водневі зв'язки є фундаментальними силами зв'язування ліганд-білок. Однак конкретні задіяні залишки та типи взаємодій можуть різнитися, враховуючи різні алгоритми та параметри, що використовуються кожним інструментом.

В цілому аналіз PLIP доповнює результати DS, надаючи додаткову інформацію про природу взаємодій, особливо про відстань у водневих зв'язках, що може мати вирішальне значення для розуміння сили та

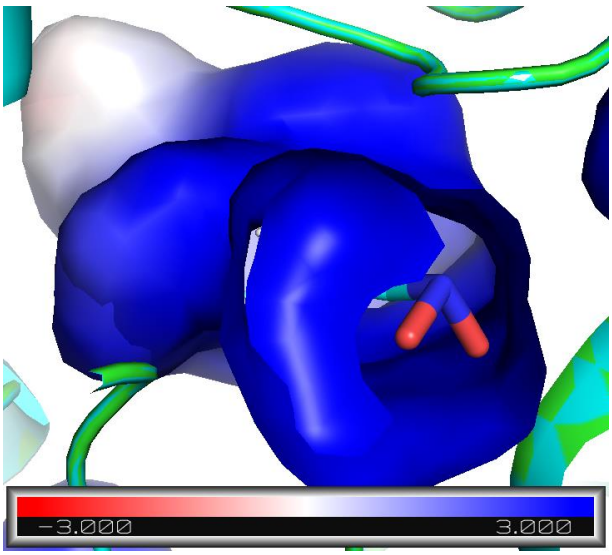
специфічності цих взаємодій. Поєднання гідрофобних взаємодій, взаємодій з водневими зв’язками, Pi-stacking та сольових містків відіграє ключову роль у стабілізації комплексу.



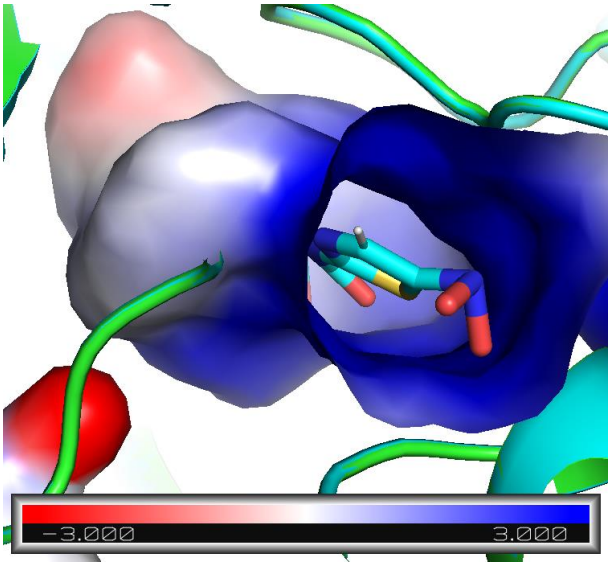
А



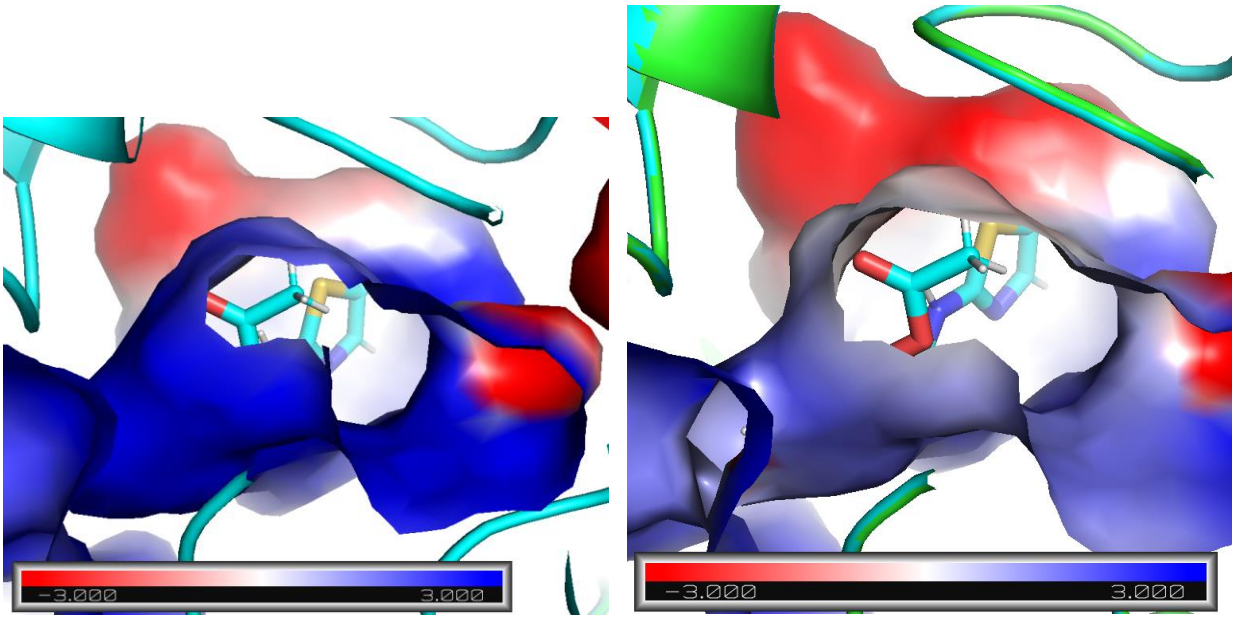
Б



В



Г



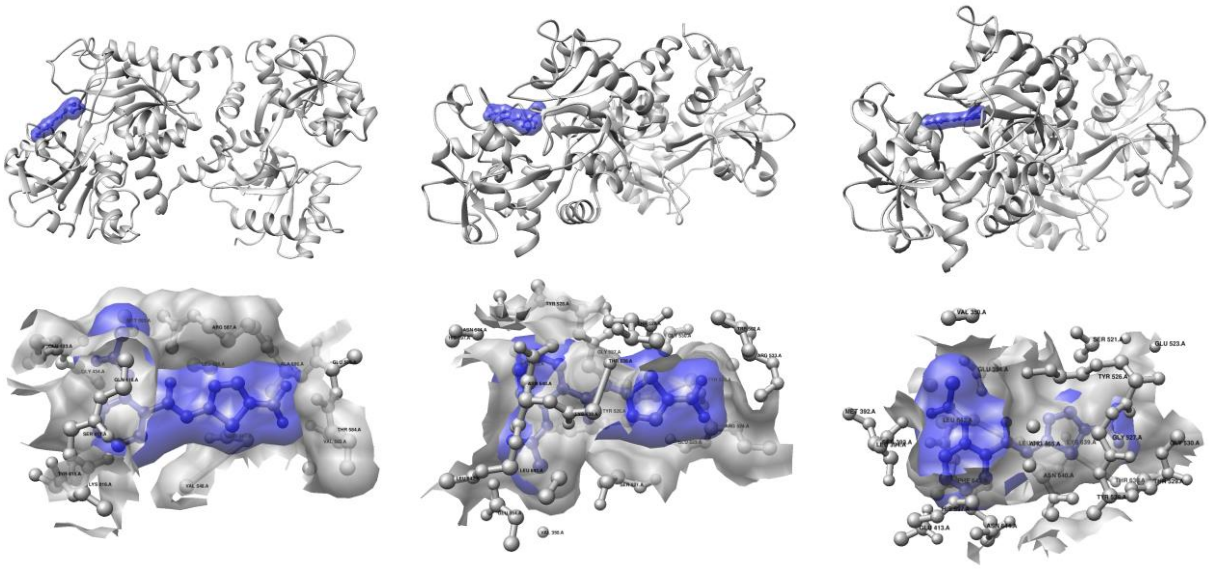
Д Е

Рис. 2.20 Електростатичний потенціал на поверхні комплексу лактоферин-нітазоксанід з програми SwissDock (А, В, Д) та чистого білка (Б, Г, Е) для комплексів 1, 2 та 3 відповідно.

Як бачимо з рисунку, для комплексу 1 – сайт зв'язування має в основному позитивний електростатичний потенціал з нейтрально-негативними вкрапленнями на поверхні (LYS – полярна заряджена, полярні TYR, ASN, полярна негативно заряджена GLU тощо), сайт 2 – посилюється частка негативно-нейтрального потенціалу (полярні TYR, ASN, SER, полярні позитивно заряджені LYS, ARG, негативно – ASP), а третій має як позитивні так і негативні ділянки однакової вираженості. Проте, що характерно для всіх 3-х комплексів, після зв'язування з лігандом ділянки взаємодій набувають більшого позитивного електропотенціалу.

2.3.2 PatchDock

На відміну від SwissDock, сайти зв'язування PatchDock зосереджені в одній зоні лактоферину (рис. 2.21).



Комплекс 1 Комплекс 2 Комплекс 3

Рис. 2.21 Візуалізація комплексів лактоферин-нітазоксанід з програми PatchDock за допомогою UCSF Chimera.

Проте за рахунок рихлості енергетичної поверхні білкової молекули кожен комплекс має різні амінокислоти в сайтах зв'язування та дещо відмінні типи взаємодій (рис. 2.22, рис. 2.23).

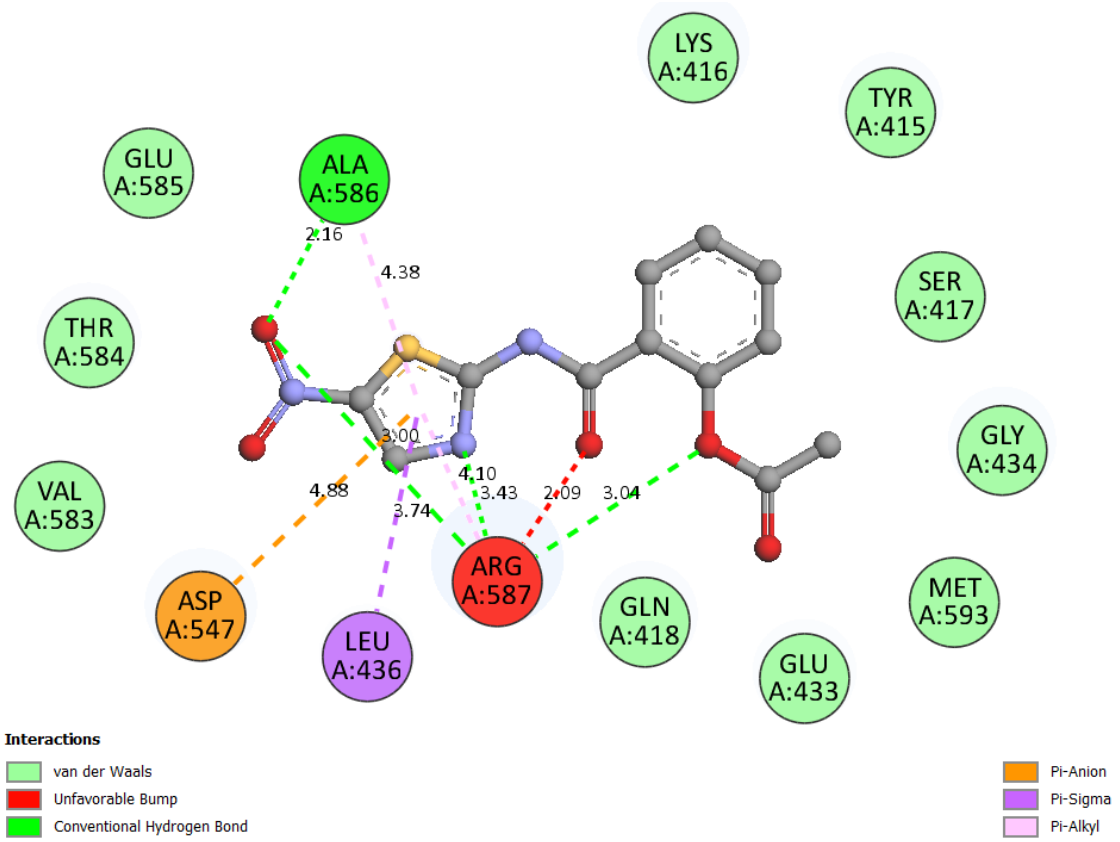
Аналізуючи взаємодію між нітазоксанідом та лактоферином з використанням Discovery Studio, ми можемо спостерігати різні закономірності молекулярних взаємодій у трьох комплексах (рис. 2.22).

Комплекс 1 характеризується різними взаємодіями: сили Ван-дер-Ваальса з GLU:585, THR:584 і VAL:583 – відіграють значну роль у початковому прикріпленні та стабілізації нітазоксаніду на сайті зв'язування. Несприятливі взаємодії з ARG:587 потенційне стеричне зіткнення, яке може вплинути на оптимальне розташування ліганду. Однак це врівноважується звичайними водневими зв'язками з ALA:586 та ARG:587, які мають вирішальне значення для встановлення специфічних та спрямованих взаємодій, необхідних для точної орієнтації нітазоксаніду. Взаємодії Pi-аніон з ASP:547 та взаємодії Pi-сігма з LEU:436 додатково сприяють спорідненості зв'язування, підкреслюючи роль різних сил у стабілізації комплексу.

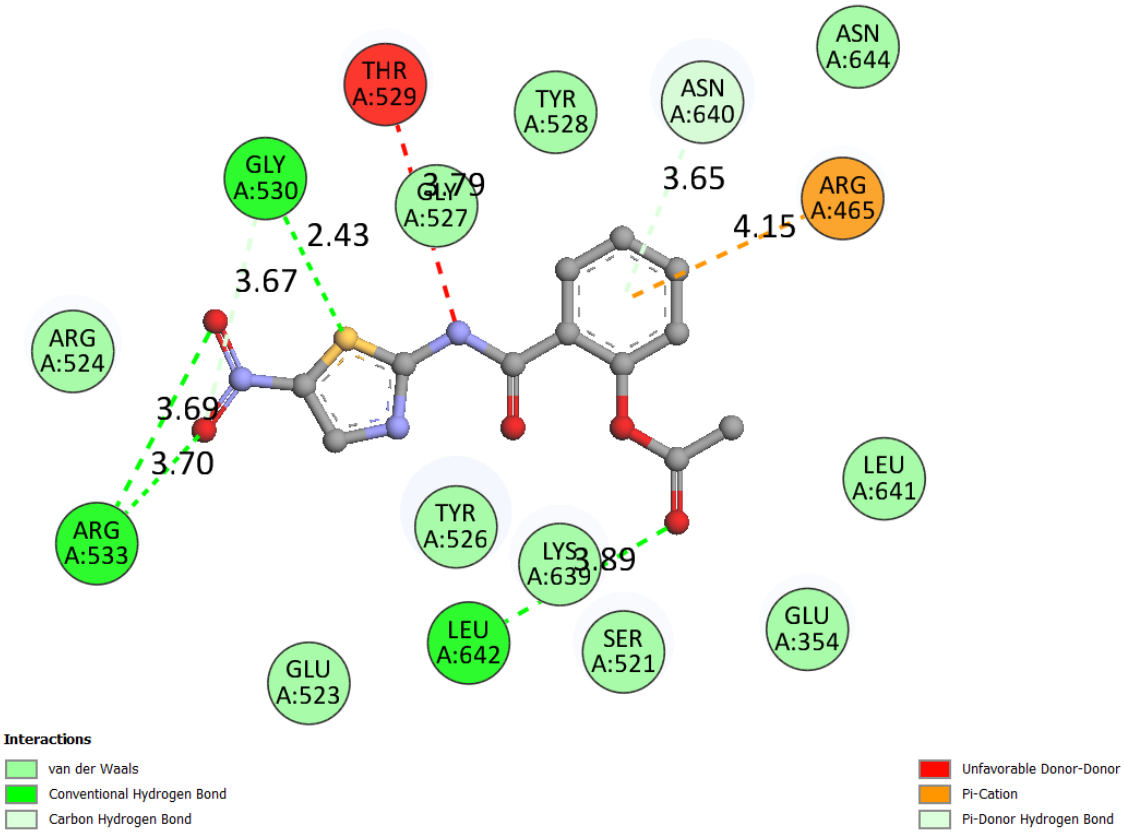
Кластер 2 є сумішшю ван-дер-ваальсових взаємодій і водневих зв’язків, при цьому ARG:524, GLY:527 і TYR:528 беруть участь у формуванні гідрофобного середовища, що сприяє зв’язуванню ліганду. Звичайні водневі зв’язки з ARG:533 і LEU:642, а також вуглецевий зв’язок з GLY:530 вказують на сильні та специфічні взаємодії, які мають вирішальне значення для стабільності комплексу. Несприятлива донор-донорної взаємодія з THR:529 може вказувати на деяке відштовхування всередині сайту зв’язування, що потенційно впливає на динаміку зв’язування. Взаємодії Pi-катіон з ARG:465 та Pi-донорні водневі зв’язки з ASN:640 підкреслюють роль ароматичних та електростатичних взаємодій у підвищенні афінності зв’язування.

Комплекс 3 примітний взаємодіями Ван-дер-Ваальса з GLY:527 і GLU:354, що передбачає щільне прилягання нітазоксаніду всередині кишені. Кластер додатково стабілізується за рахунок безлічі звичайних водневих зв’язків з LEU:642, ASN:640 та TYR:528, які забезпечують специфічність та міцність взаємодії ліганд-білок. Вуглецевий водневий зв’язок з THR:529 та Pi-донорний водневий зв’язок з HIS:597 ускладнюють взаємодію, підкреслюючи багатогранний характер процесу зв’язування.

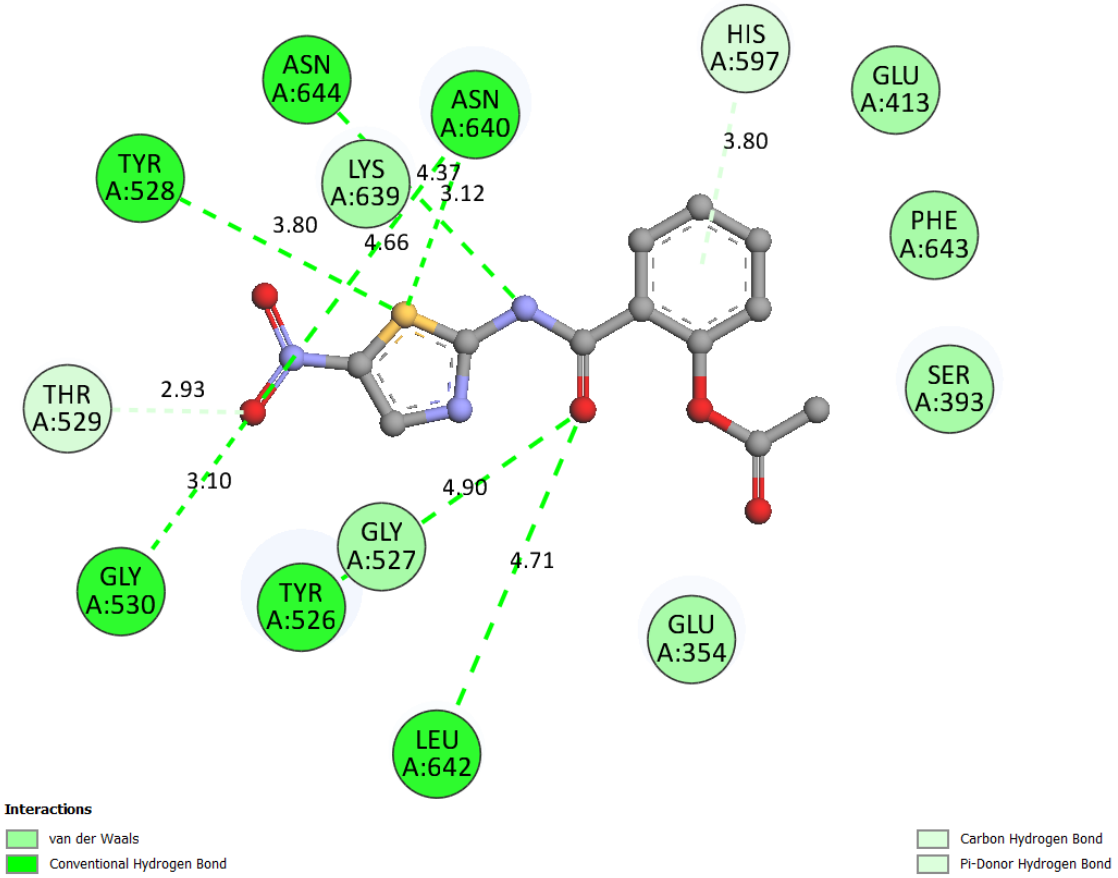
Таким чином, у всіх трьох кластерах існує збалансована взаємодія гідрофобних, водневих зв’язків та Pi-взаємодій, кожен з яких сприяє загальній стабільності та специфічності комплексу нітазоксанід-лактоферин. Участь певних залишків у цих взаємодіях між кластерами, що повторюється, може вказувати на їх критичну роль у механізмі зв’язування, надаючи цінну інформацію для розуміння молекулярної основи цієї взаємодії та для спрямування майбутніх зусиль з розробки та оптимізації ліків.



Комплекс 1



Комплекс 2



Комплекс 3

Рис. 2.22 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів PatchDock лактоферин-нітазоксанід з у програмі BIOVIA Discovery Studio

Аналізуючи взаємодію між нітазоксанідом та лактоферином з використанням PLIP (рис.. 2.23), ми можемо також виявити різні моделі взаємодії у трьох кластерах, кожен з яких унікальним чином сприяє стабільності та специфічності ліганд-білкового комплексу.

Кластер 1 характеризується поєднанням гідрофобних взаємодій та водневих зв’язків, а також сольових містків, які в сукупності сприяють стабільності та специфічності комплексу. Гідрофобні взаємодії з TYR:415 та GLU:433 передбачають його роль у закріпленні нітазоксаніду всередині гідрофобних кишень лактоферину, полегшуючи початкове прикріплення. Водневий зв’язок і сольовий місток з ARG:587 вказують на сильну і

специфічну взаємодію, яка відіграє вирішальну роль у точній орієнтації та стабілізації нітазоксаніду всередині сайту зв’язування.

Кластер 2 демонструє різноманітніший набір взаємодій. Гідрофобні взаємодії з GLU:354, TYR:528, ASN:640 та LEU:641 передбачають значний внесок у загальну стабільність комплексу за рахунок створення гідрофобного середовища, сприяючи зв’язуванню ліганду. Водневі зв’язки з GLU:354, THR:529, GLY:530 та LEU:642 вказують на специфічні та сильні взаємодії, які необхідні для підтримки структурної цілісності та правильного позиціонування нітазоксаніду. Ці взаємодії наголошують на важливості як гідрофобних сил, так і водневих зв’язків у забезпеченні взаємодії ліганд-білок.

Кластер 3 характеризується переважно гідрофобними взаємодіями та водневими зв’язками. Гідрофобна взаємодія з ASN:644 передбачає його роль у формуванні структури комплексу, можливо, допомагаючи правильному вирівнюванню нітазоксаніду. Водневий зв’язок із SER:2393 додатково стабілізує комплекс, забезпечуючи специфічність та міцність взаємодії ліганд-білок. Цей кластер показує важливість збалансованості між гідрофобними взаємодіями та водневими зв’язками у загальній стабільності комплексу.

Таким чином, PLIP-аналіз у всіх трьох кластерах виявляє складну взаємодію гідрофобних, водневих зв’язків та електростатичних взаємодій, кожна з яких сприяє стабільності та специфічності комплексу нітазоксанід-лактоферин. Участь специфічних залишків у цих взаємодіях у різних кластерах підкреслює їхню потенційну важливість у механізмі зв’язування, даючи цінну інформацію для розуміння молекулярної основи цієї взаємодії та для визначення майбутніх терапевтичних стратегій.

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	415A	TYR	3.77	5353	3195
2	433A	GLU	3.99	5357	3332

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	587A	ARG	2.76	3.43	125.52	✓	✓	4512 [Ng+]	5340 [Nar]

Salt Bridges

Index	Residue	AA	Distance	Protein positive?	Ligand Group	Ligand Atoms
1	587A	ARG	4.55	✓	Carboxylate	5355, 5358

Комплекс 1

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	354A	GLU	3.55	5357	2760
2	528A	TYR	3.70	5351	4058
3	528A	TYR	2.76	5352	4062
4	640A	ASN	3.35	5354	4928
5	641A	LEU	3.93	5357	4938

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	354A	GLU	2.36	2.78	106.34	✓	✓	2763 [O3]	5358 [O2]
2	529A	THR	3.13	3.79	125.11	✓	×	4066 [Nam]	5344 [Nam]
3	530A	GLY	2.88	3.79	153.32	✓	×	4073 [Nam]	5344 [Nam]
4	642A	LEU	3.15	3.89	132.62	✓	×	4940 [Nam]	5358 [O2]

Комплекс 2

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	644A	ASN	3.62	5352	4963

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	393A	SER	3.18	3.85	126.84	✔	✖	3036 [Nam]	5358 [O2]

Комплекс 3

Рис. 2.23 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів PatchDock лактоферин-нітазоксанід з у програмі PLIP

2.3.3 Висновки

У результатах SwissDock та PatchDock спостерігається ряд типів взаємодії, включаючи сили Ван-дер-Ваальса, звичайні водневі зв'язки та Pi-взаємодії. Результати PatchDock також підкреслюють гідрофобні взаємодії, які здаються менш помітними у даних SwissDock. Ці відмінності можуть відображати різні підходи, які використовує кожен інструмент закріплення для моделювання взаємодій.

Взаємодія нітазоксаніду з лактоферином включає низку амінокислот, які мають вирішальне значення для функції білка. Взаємодія зі специфічними амінокислотами, такими як GLU:354, ASN:640, TYR:526, VAL:11 та LEU:299, передбачає прямий вплив на функцію лактоферину. Ці взаємодії різних типів, такі як Pi-аніонні, Pi-катіонні та ван-дер-ваальсові, вказують на значну роль цих залишків у зв'язуванні та стабілізації ліганду.

Близькість нітазоксаніду до певних залишків може вказувати на потенційні алостеричні або ортостеричні ефекти. Наприклад, якщо TYR:526 або ASN:640 знаходяться в зоні сайту зв'язування, ліганд поблизу цих залишків може вплинути на функцію білка через їх роль у зв'язуванні субстрату або каталітичній активності. Навіть периферичні взаємодії, такі як з VAL:11 і LEU:299, можуть викликати конформаційні зміни, що впливають на

функцію білка, особливо якщо ці залишки є частиною більшої зв'язуючої кишені або примикають до областей, критичних для функції білка.

Участь ARG:587 у багатьох типах взаємодій, включаючи водневі зв'язки, гідрофобні взаємодії та сольові містки є головним показником його значущості. Взаємодія ліганду з іншими залишками, як-от ALA:586, TYR:415 та GLU:433, може призвести до конформаційних змін, які впливають на активний білковий центр.

Крім того, ван-дер-ваальсові та водневі зв'язки з ARG:524, TYR:528, ASN:644, GLY:527 та GLU:354 показують щільне прилягання ліганду всередині центру зв'язування, що може призвести до стеричних перешкод чи сприяти модуляція функції активного центру. Ці взаємодії можуть впливати на доступність субстрату, потенційно блокуючи або полегшуючи функцію білка. Щоб зробити остаточні заяви про функціональні наслідки, конкретний ефект нітазоксаніду на функцію лактоферину – будь то активація, інгібування чи модуляція, будуть потрібні подальші експериментальні дослідження.

Сумісні результати двох методів щодо взаємодіючих залишків та типів взаємодії підвищує впевненість у результатах моделювання. Проте відмінності підкреслюють необхідність використання декількох обчислювальних підходів для отримання всебічного розуміння біомолекулярних взаємодій.

Узагальнену інформацію про взаємодії представлено у таблицях 2.5 та 2.6.

Таблиця 2.5 Аналіз комплексу лактоферин-нітозаксонід, розрахованому у SwissDock

	Комплекс 1	Комплекс 2	Комплекс 3
Сайт зв'язування	VAL:350, TYR:526, LEU:642,	TYR:526, ASN:640, GLY:527,	VAL:11, PRO:42, PHE:190, SER:184,

	GLU:354, GLY:527, ASN:640, LEU:641, PRO:519, THRL529, GLY:530, THR:638, LEU:394, MET:392, SER:393, PHE:643, ARG:465, TYR:528, LYS:639, SER:521, ASN:520, THR:377	HSE:597, LYS:639, SER:521, LEU:641, GLU:354, LEU:642, PHE:643, SER:393, LEU:394, TYR:398, THR:377, TYR:528, ARG:465, THR:638, ASP:395	HSE:253, LEU:299, THR:58, ASP:297, SER:185, SER:12, LYS:296, LEU:298, GLU:15, PHE:300, LYS:301, ASP:60, LEU:59, ARG:121, PHE:183, SER:41, ASP:40
Типи зав’язків	Pi-Alkyl, Alkyl, Pi-Pi T-shaped, Pi-Sulfur, Pi-Anion, Pi-Cation, Unfavorable Metal-Donor, Metal-Acceptor, Conventional Hydrogen Bond, Van der Waals, Hydrophobic	Pi-Pi T-shaped, Pi-Cation, Metal-Acceptor, Conventional Hydrogen Bond, Van der Waals, Hydrophobic Bonds, Pi-Stacking, Salt Bridges	Pi-Alkyl, Pi-Pi T-shaped, Pi-Cation, Metal-Acceptor, Conventional Hydrogen Bond, Van der Waals, Hydrophobic Interactions, Hydrogen Bonds

	Interactions, Hydrogen Bonds		
Взаємодія з активним центром та біологічні наслідки	Взаємодія з такими амінокислотами, як GLU:354 та ASN:640, вказує на потенційний вплив на функцію білка. Близькість до TYR:526 вказує на потенційний вплив на активний центр або доступність субстрату.	Взаємодія з залишками TYR:526 та GLY:530 може вказувати на потенційний вплив на функцію білка. Взаємодія із залишками типу GLU:354 може означати прямий або опосередкований вплив на активність.	Взаємодія з VAL:11 та LEU:299 вказує на потенційний опосередкований вплив на функцію білка. Тісна взаємодія з THR:58 та ASP:297 може змінювати функціональність білка.

Таблиця 2.6 Аналіз комплексу лактоферин-нітозаксонід, розрахованому у PatchDock

	Комплекс 1	Комплекс 2	Комплекс 3
Сайт зв’язування	GLU:585, THR:584, VAL:583, GLN:418, GLU:433, MET:593, GLY:434, SER:417, TYR:415, LYS:416	ARG:524, GLY:527, TYR:528, ASN:644, LEU:641, GLU:354,	GLY:527, GLU:354, SER:393, PHE:643, GLU:413, LYS:639

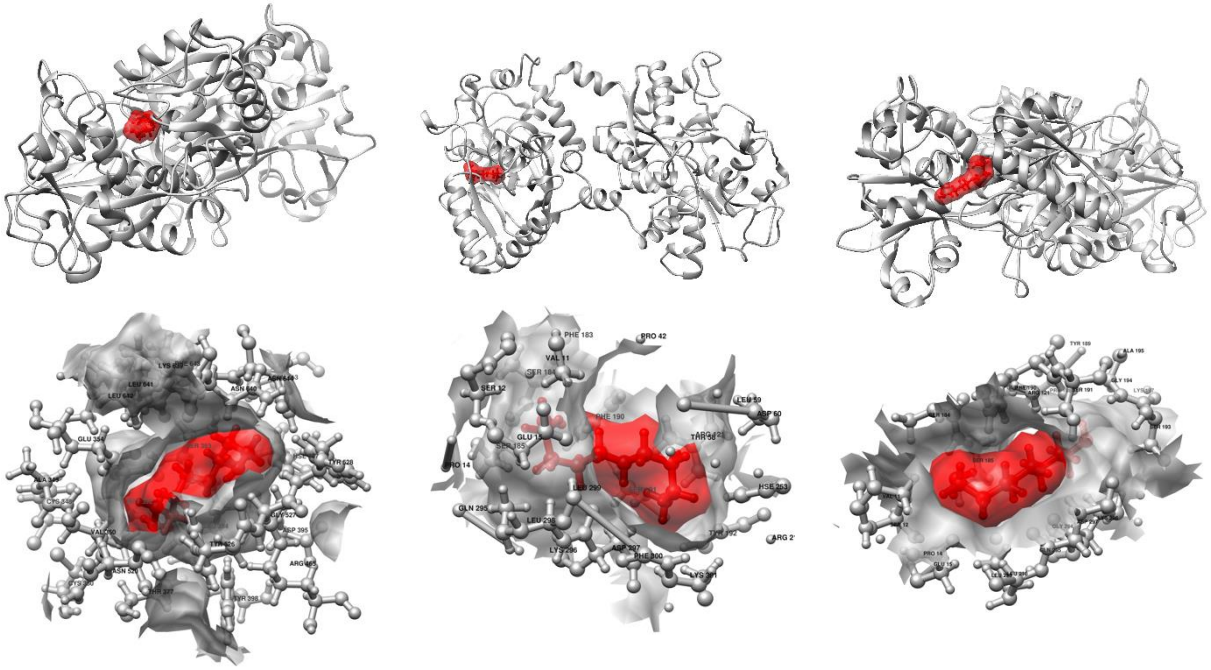
		SER:521, LYS:639, TYR:526, GLU:523	
Типи зав’язків	Van der Waals, Conventional Hydrogen Bond, Pi-Anion, Pi-Sigma, Pi-Alkyl	Van der Waals, Conventional Hydrogen Bond, Carbon Hydrogen Bond, Pi-Cation, Pi-Donor Hydrogen Bond	Van der Waals, Conventional Hydrogen Bond, Carbon Hydrogen Bond, Pi-Donor Hydrogen Bond
Взаємодія з активним центром та біологічні наслідки	Взаємодія з GLU:585 та THR:584 може вказувати на потенційний вплив на функцію білка. Взаємодія із залишками GLU:433 та MET:593 може означати прямий або опосередкований вплив на активність.	Взаємодія з ARG:524 та GLY:527 може свідчити про потенційний вплив на функцію білка. Близькість до GLU:354 та ASN:644 вказує на можливий вплив на активний центр або доступність	Взаємодія з GLY:527 та GLU:354 вказує на потенційні зміни у функціональності білка. Взаємодія з PHE:643 та LYS:639 може впливати на динаміку активних центрів білка.

		субстрату.	

2.4 Лактоферин та спермідин

2.4.1 SwissDock

Комплекси 2 та 3 мають схожі сайти звязування, проте перший комплекс має суттєві відмінності (рис. 2.24).



Комплекс 1 Комплекс 2 Комплекс 3

Рис. 2.24 Візуалізація комплексів лактоферин-спермідин з програми SwissDock за допомогою UCSF Chimera.

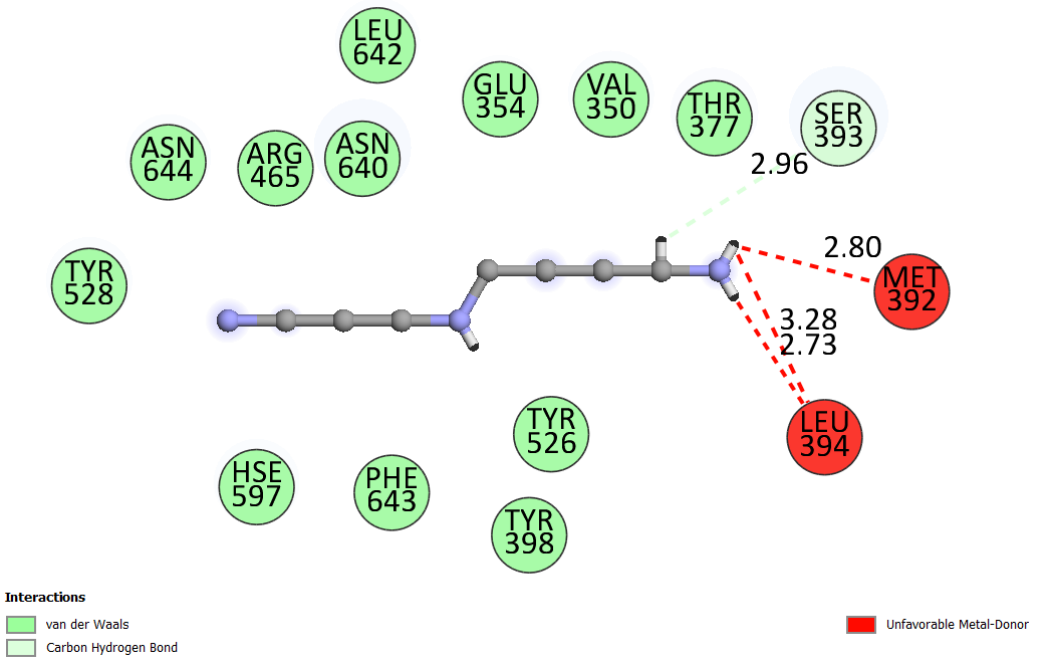
Аналіз стикування спермідину з лактоферрином з використанням SwissDock у Discovery Studio зображено на рисунку 2.25.

Кластер 1 характеризується поєднанням несприятливих взаємодій метал-донор та більш стабілізуючих взаємодій, таких як вуглець-водневі зв’язки та сили Ван-дер-Ваальса. Несприятливі взаємодії метал-донор, особливо з MET:392 та LEU:394, передбачають потенційне субоптимальне вирівнювання ліганду з іонами ключових металів в активному центрі, що може

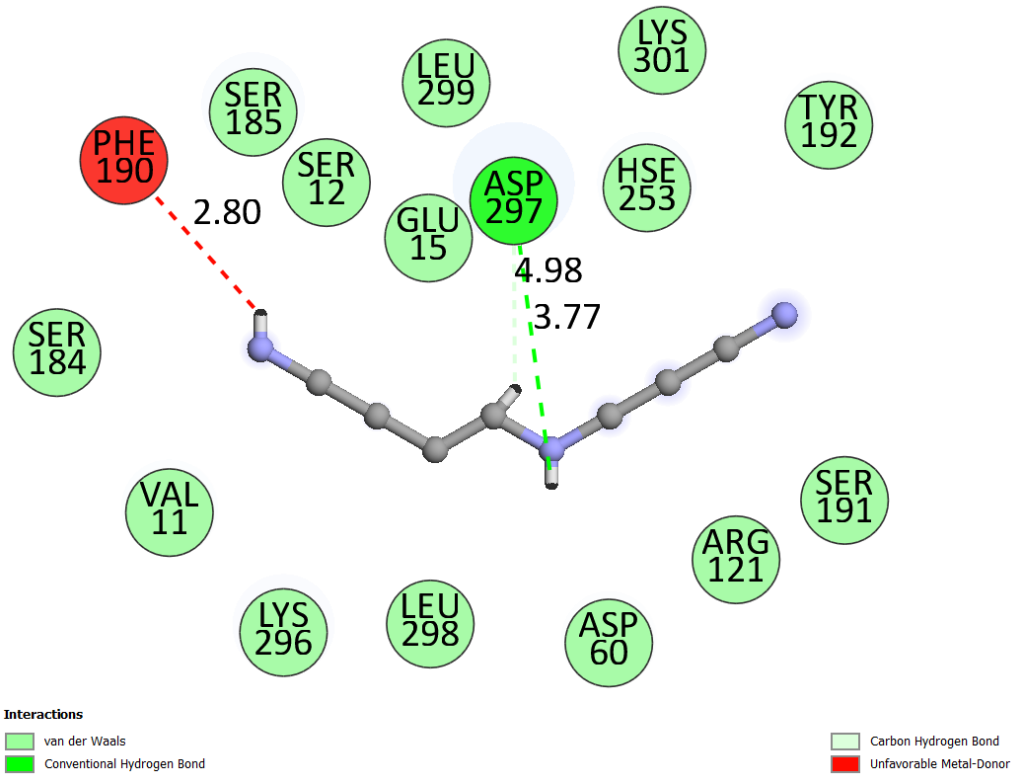
вплинути на ефективність зв'язування. Взаємодії Ван-дер-Ваальса з TYR:528, ASN:644 і ARG:465 вказують на щільне прилягання всередині сайту та комплементарні форми і гідрофобність ліганду і білка.

Кластер 2 демонструє іншу картину зв'язків з несприятливою взаємодією метал-донор за участю PHE:190. Наявність вуглеводневого зв'язку та звичайного водневого зв'язку з ASP:297 вказує на специфічні взаємодії, які мають вирішальне значення для точної орієнтації та закріплення спермідину всередині сайту зв'язування. Взаємодія Ван-дер-Ваальса з різними залишками, включаючи SER:184 і VAL:11, передбачає широку поверхню контакту між спермідином і лактоферрином, що сприяє стабільності комплексу.

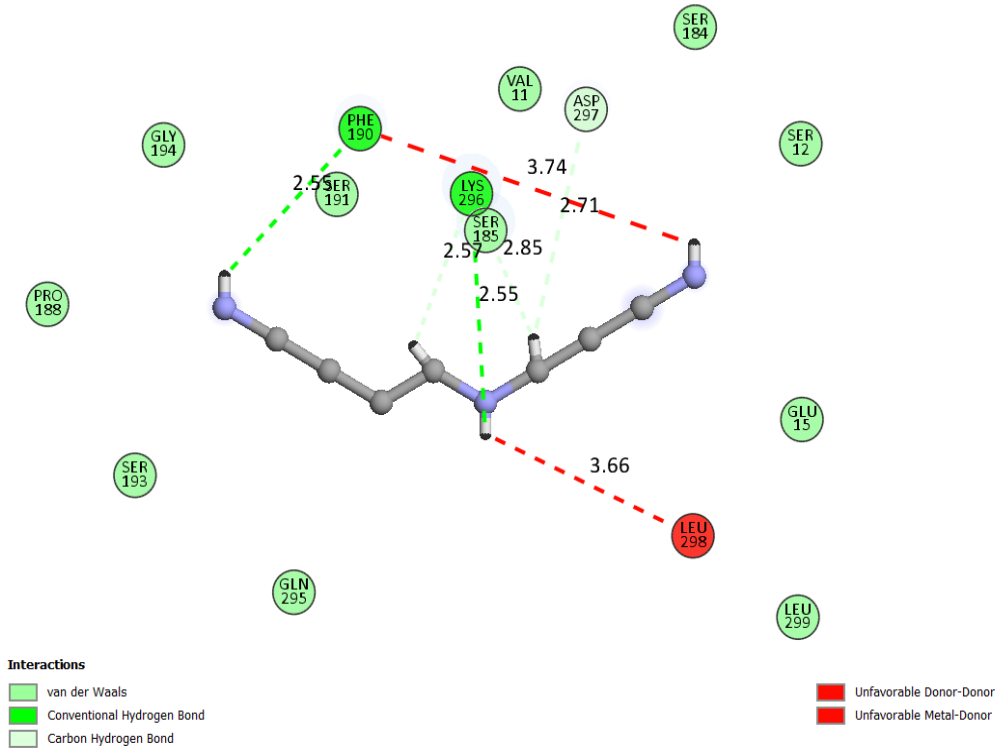
Кластер 3 – це поєднання несприятливих метал-донорних та донор-донорних взаємодій, вуглець-водневих та звичайних водневих зв'язків. Несприятливі взаємодії з LEU:298 та PHE:190 можуть вказувати на області, де можна оптимізувати ліганд-білковий комплекс. Вуглець-водневі та звичайні водневі зв'язки з LYS:296 та ASP:297 відповідно вказують на сильні та специфічні взаємодії, що стабілізують комплекс. Взаємодії Ван-дер-Ваальса в цьому кластері із такими залишками, як PRO:188 і SER:193, додатково сприяють афінності і специфічності зв'язування.



Комплекс 1



Комплекс 2



Комплекс 3

Рис. 2.25 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів SwissDock лактоферин-спермідин з у програмі BIOVIA Discovery Studio

Аналіз стикування спермідину з лактоферином з використанням PLIP (рис.2.26).

Кластер 1 характеризується взаємодією одного водневого зв'язку за участю SER:393. Цей водневий зв'язок, ймовірно, робить значний внесок у специфічність і спорідненість зв'язування через спрямований характер зв'язку. Наявність лише однієї зазначеної взаємодії в цьому кластері передбачає відносно сфокусований режим зв'язування, при цьому SER:393 відіграє ключову роль у орієнтації та позиціонуванні спермідину всередині сайту зв'язування.

Кластер 2 демонструє різноманітнішу картину взаємодії з множинними водневими зв'язками, що включають SER:185 та ASP:297. Ці водневі зв'язки свідчать про сильні та специфічні взаємодії, які мають головне значення для підтримки структурної цілісності ліганд-білкового комплексу.

Кластер 3 являє собою комбінацію гідрофобних та водневих взаємодій. Гідрофобний зв'язок з LYS:296 може сприяти внутрішній стабільності структури білка. Водневі зв'язки з SER:185, PHE:190 та LYS:296 додатково підтримують структуру кластера, забезпечуючи як стабільність, так і специфічність.

У цілому, у аналізі PLIP водневі зв'язку грають вирішальну роль. Ці взаємодії поряд з гідрофобними створюють міцне і специфічне середовище зв'язування. Детальне розуміння цих взаємодій цінне для розуміння молекулярної основи зв'язування спермідину та для спрямування майбутніх зусиль щодо розробки та оптимізації ліків.

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	393A	SER	3.25	3.68	106.91	×	✓	10573 [N3]	6029 [O2]

Комплекс 1

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	185A	SER	2.91	3.62	128.94	✓	✓	2833 [Nam]	10573 [N3]
2	297A	ASP	2.97	3.60	120.51	×	✓	10568 [N3]	4588 [O2]
3	297A	ASP	2.15	3.12	157.79	×	✓	10564 [N3]	4586 [O2]

Комплекс 2

Hydrophobic Interactions

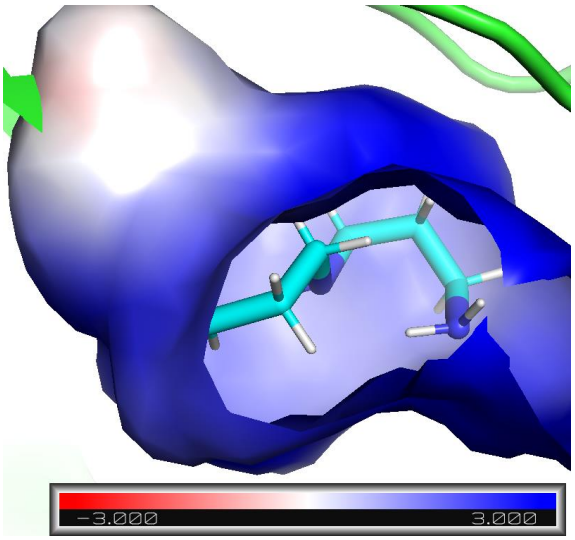
Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	296A	LYS	3.97	10571	4559

Hydrogen Bonds

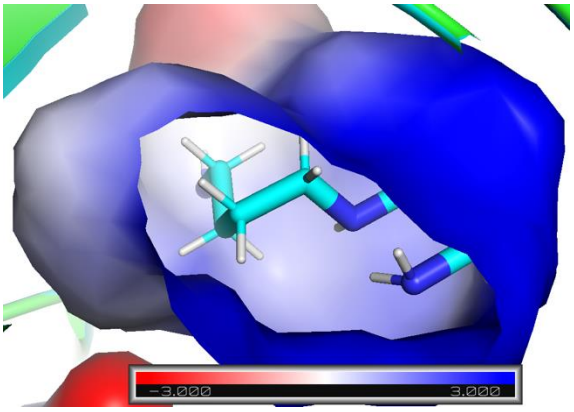
Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	185A	SER	2.72	3.51	136.33	✓	✓	2833 [Nam]	10564 [N3]
2	190A	PHE	2.55	3.49	151.79	×	✓	10573 [N3]	2930 [O2]
3	296A	LYS	2.55	3.16	118.12	×	✓	10568 [N3]	4576 [O2]

Комплекс 3

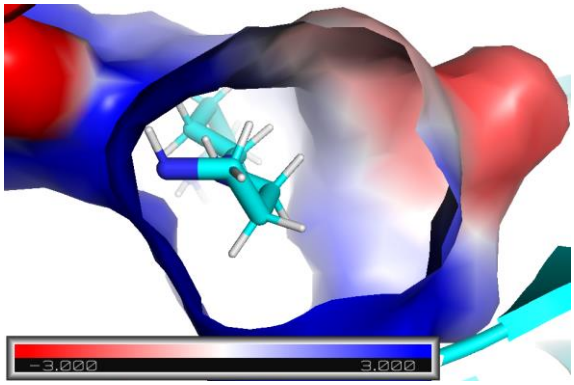
Рис. 2.26 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів SwissDock лактоферин-спермідин з у програмі PLIP



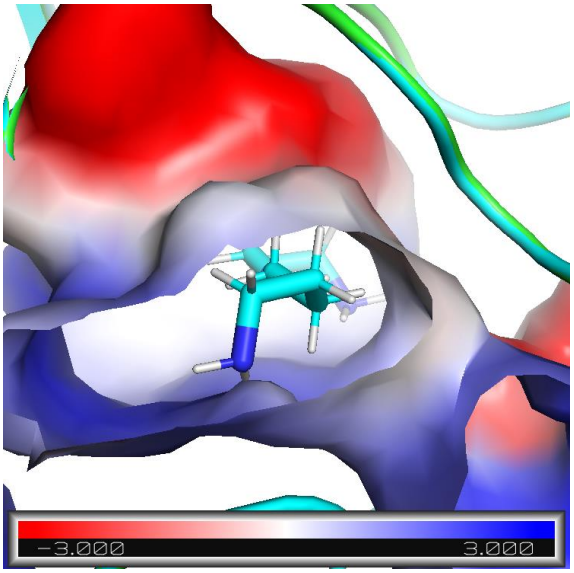
А



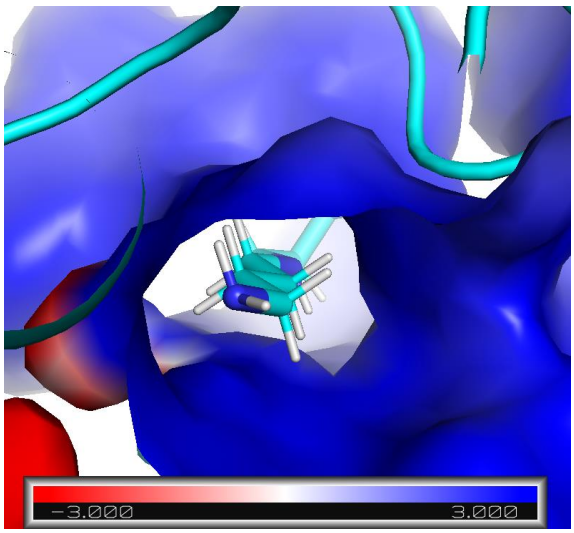
Б



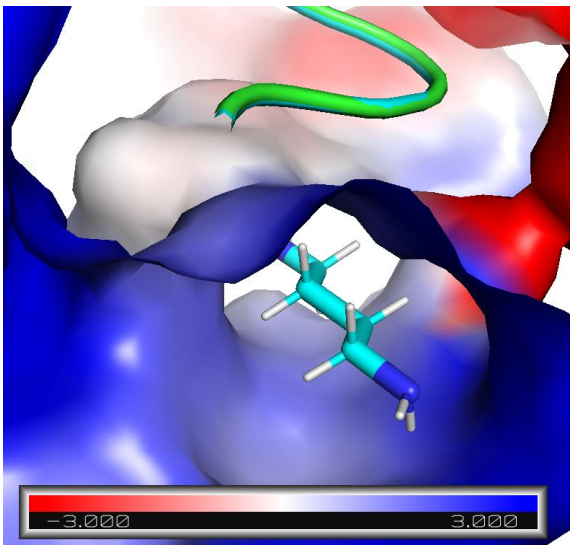
В



Г



Д



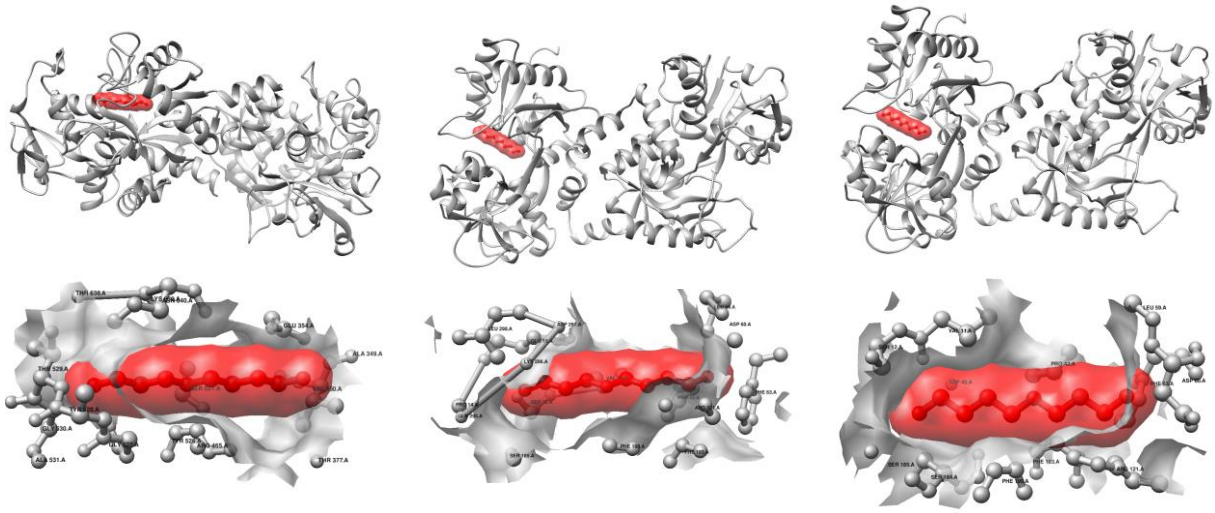
Е

Рис. 2.27 Електростатичний потенціал на поверхні комплексу лактоферин-спермідин з програми SwissDock (А, В, Д) та чистого білка (Б, Г, Е) для комплексів 1, 2 та 3 відповідно.

Як бачимо з рисунку, для комплексу 1 – сайт зв'язування як і випадку з нітазоксанідом має в основному позитивний електростатичний потенціал з нейтрально-негативними вкрапленнями на поверхні (ARG – полярна заряджена позитивно, полярні SER, TYR, ASN, THR, полярна негативно заряджена GLU тощо), сайт 2 – як негативно-нейтральний потенціал, так і позитивний (полярна SER, полярні позитивно заряджені LYS, ARG, негативно – ASP, GLU), а третій має більшості позитивно-нейтральний потенціал (полярні SER, GLN). Проте, що характерно для всіх 3-х комплексів, після зв'язування з лігандом ділянки взаємодій набувають ледь помітного більшого позитивного електропотенціалу.

2.4.2 PatchDock

Спостерігаємо таку ж саму ситуацію, як із SwissDock: комплекси 2 і 3 доволі схожі, проте перший виділяється (рис. 2.28).



Комплекс 1 Комплекс 2 Комплекс 3

Рис. 2.28 Візуалізація комплексів лактоферин-спермідин з програми PatchDock за допомогою UCSF Chimera.

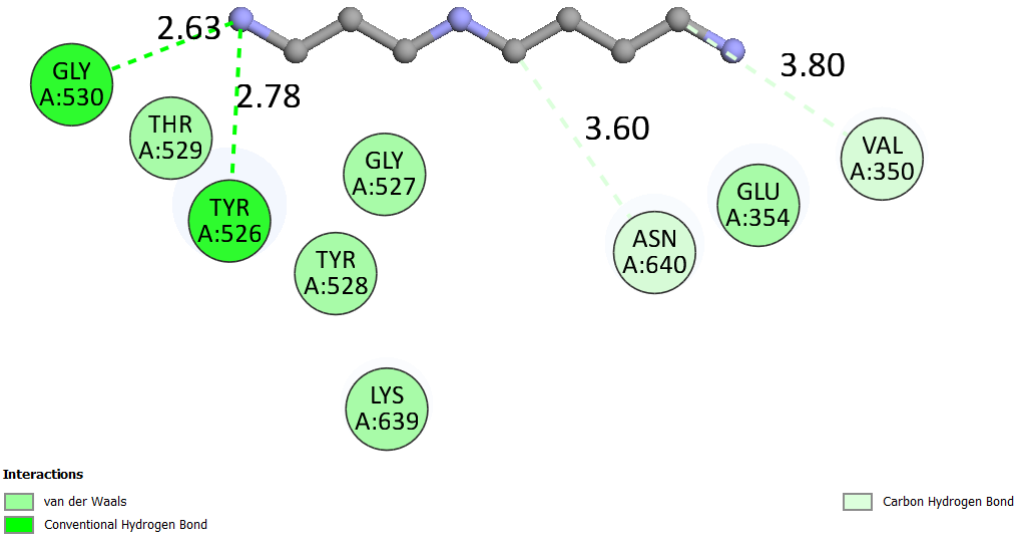
Аналіз стикування спермідину з лактоферрином за допомогою Patch Dock у Discovery Studio зображено на рисунку 2.29.

Комплекс 1 характеризується поєднанням ван-дер-ваальсових взаємодій та водневих зв'язків. Взаємодії Ван-дер-Ваальса за участю THR:529, GLY:527, TYR:528, LYS:639 та GLU:354 передбачають сприятливу взаємодію з бічними ланцюгами цих залишків, потенційно збільшуючи площу зв'язуючої поверхні. Звичайні водневі зв'язки з GLY:530 та TYR:526, а також вуглецеві водневі зв'язки за участю ASN:640 та VAL:350 вказують на сильні та специфічні взаємодії, що мають вирішальне значення для підтримки структурної цілісності ліганд-білкового комплексу.

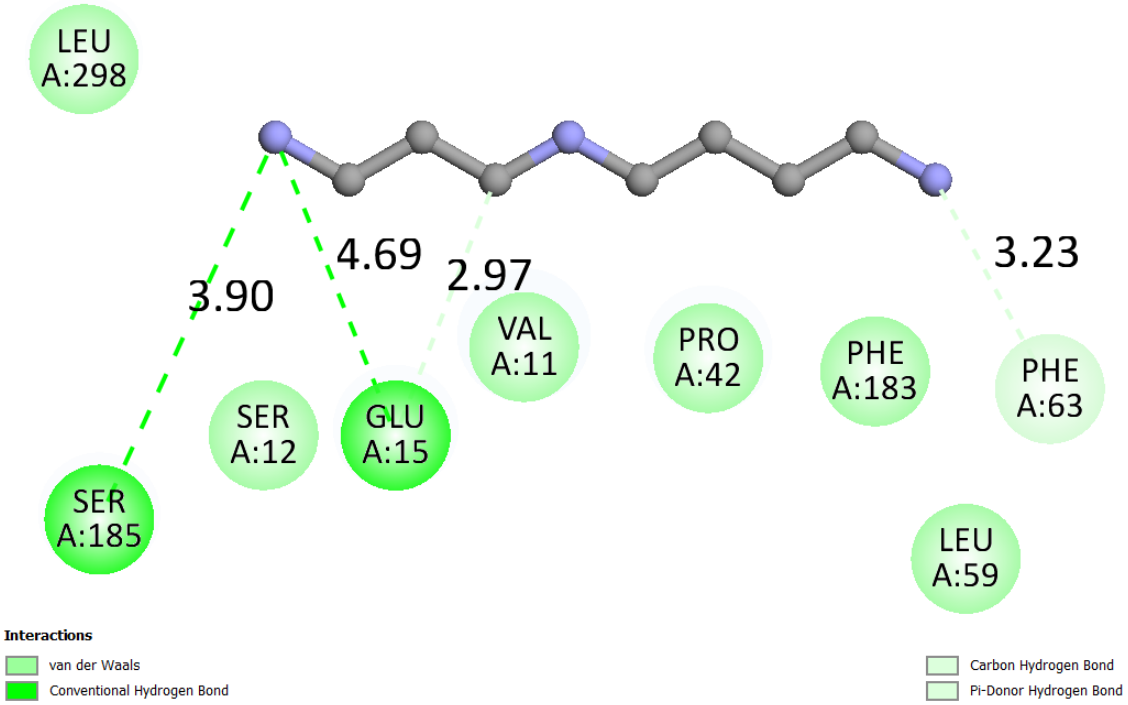
Комплекс 2 представляє іншу картину зв'язків з акцентом на взаємодіях Ван-дер-Ваальса SER:12, VAL:11, PRO:42, PHE:183, LEU:59 і LEU:298. Ці взаємодії вказують на щільне прилягання всередині сайту, комплементарні форми і гідрофобність ліганду і білка. Звичайний водневий зв'язок з GLU:15 і вуглець-водневий зв'язок з тим же залишком, а також Pi-донорний водневий зв'язок з PHE:63 додатково стабілізують комплекс, забезпечуючи додаткову специфічність та міцність взаємодії ліганд-білок.

Комплекс 3 демонструє структуру, аналогічну Комплексу 2, з більшістю взаємодій Ван-дер-Ваальса(ASP:60, ARG:121, PHE:183, PRO:42, PHE:190 та SER:12). Звичайний водневий зв'язок з PHE:63 та вуглець-водневі зв'язки з VAL:11 та SER:184 сприяють стабільності та специфічності взаємодії. Ці зв'язки із взаємодіями Ван-дер-Ваальса передбачають міцне та специфічне середовище зв'язування.

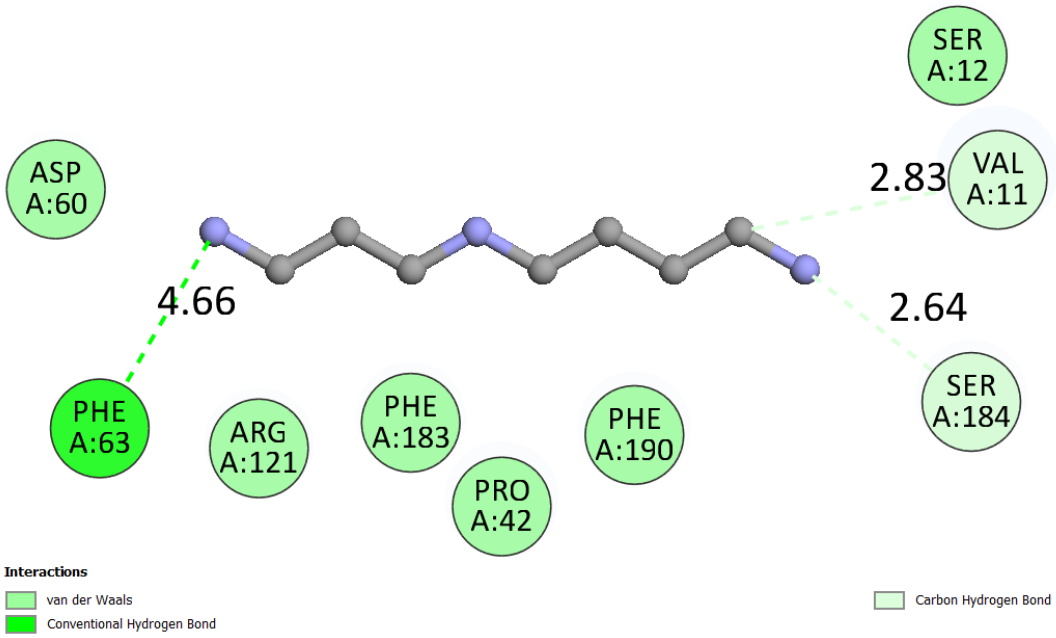
Загалом аналіз передбачає стабільну взаємодію між спермідином та лактоферрином, що характеризується балансом гідрофобних взаємодій та взаємодій з водневими зв'язками. Участь певних залишків, таких як PHE:63 і GLU:15 повторюється в утворенні водневих зв'язків в різних комплексах і підкреслює їх важливість в механізмі зв'язування.



Комплекс 1



Комплекс 2



Комплекс 3

Рис. 2.29 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів PatchDock лактоферин-спемідин з у програмі BIOVIA Discovery Studio

Аналіз стикування спермідину з лактоферином з використанням PLIP зображено на рис. 2.30.

Кластер 1 характеризується поєднанням гідрофобних взаємодій та водневих зв'язків. Гідрофобні з TYR:526 сприяють утворенню гідрофобного ядра. Водневі зв'язки з VAL:350, TYR:526, THR:529 та GLY:530 вказують на високоспецифічну та стабільну сітку взаємодій.

Кластер 2 має більш просту мережу зв'язків з акцентом на гідрофобні та водневі зв'язки. Гідрофобна взаємодія з PRO:42 може сприяти структурній цілісності білка. Водневі зв'язки з SER:12 і SER:185 також впливають на цілісність комплексу ліганд-білок.

Кластер 3 демонструє структуру, аналогічну кластеру 1, з поєднанням гідрофобних взаємодій та водневих зв'язків. Гідрофобні взаємодії з VAL:11, PRO:42, PHE:63 та PHE:183 можуть вказувати на стабільність зв'язування усередині білка. Водневі зв'язки з VAL:11, ASP:60 та SER:185 додатково

підтримують структуру кластера, забезпечуючи як стабільність, так і специфічність.

Загалом, кожен кластер демонструє індивідуальний баланс гідрофобних та водневих зв'язків, які разом створюють стабільне та специфічне середовище, що сприяє зв'язуванню. Участь певних залишків у цих взаємодіях між кластерами, таких як TYR:526 і VAL:350, може вказувати на загальне структурне або функціональне значення в формування зв'язку лактоферин-спермідин.

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	526A	TYR	3.22	5344	4047
2	526A	TYR	3.73	5340	4046

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	350A	VAL	3.43	3.92	113.23	✓	×	2726 [Nam]	5347 [N3]
2	526A	TYR	1.89	2.78	143.63	×	×	5338 [N3]	4041 [O2]
3	529A	THR	2.08	2.53	105.53	✓	×	4066 [Nam]	5338 [N3]
4	530A	GLY	1.73	2.63	150.39	✓	×	4073 [Nam]	5338 [N3]

Комплекс 1

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	42A	PRO	2.94	5345	344

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	12A	SER	2.23	3.09	148.44	✓	✓	99 [O3]	5338 [N3]
2	12A	SER	2.57	3.09	111.68	×	✓	5338 [N3]	99 [O3]
3	185A	SER	3.38	3.90	116.28	✓	✓	1422 [O3]	5338 [N3]

Комплекс 2

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	11A	VAL	3.28	5344	93
2	42A	PRO	3.67	5340	344
3	63A	PHE	3.95	5340	495
4	183A	PHE	3.67	5340	1408

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	11A	VAL	2.80	3.20	104.05	×	×	5347 [N3]	90 [O2]
2	60A	ASP	2.59	3.35	133.85	✓	×	472 [Nam]	5338 [N3]
3	60A	ASP	3.29	3.81	117.53	✓	✓	479 [O3]	5338 [N3]
4	60A	ASP	2.88	3.81	153.08	×	✓	5338 [N3]	479 [O3]
5	185A	SER	3.15	4.00	145.22	✓	×	1417 [Nam]	5347 [N3]

Комплекс 3

Рис. 2.30 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів PatchDock лактоферин-спермідин з у програмі PLIP

2.4.3 Висновки

Обидва методи докінгу виявляють взаємодії з залишками ASP:60 і ARG:121 – важливими для функцій лактоферину зв’язування заліза і карбонат-іонів. Це спостереження для результатів обох сервісів передбачає, що спермідин дійсно може впливати на ці критичні функціональні ділянки лактоферину.

У результатах SwissDock та PatchDock спостерігалися різні типи взаємодії, включаючи сили Ван-дер-Ваальса, звичайні водневі зв’язки та вуглець-водневі зв’язки. Проте результати PatchDock також виявили гідрофобні взаємодії, які не були настільки помітними в даних SwissDock. Ці відмінності можуть відображати різні алгоритми та системи оцінки, які використовуються кожним інструментом стикування.

Взаємодія спермідину з ключовими залишками лактоферину передбачає потенційну модуляцію біологічних функцій лактоферину. Однак конкретні наслідки цих взаємодій, такі як вплив на протимікробну активність або залізозв'язувальну здатність, вимагатимуть подальшого експериментального підтвердження.

Узагальнену інформацію про взаємодії представлено у таблицях 2.7 та 2.8.

Таблиця 2.7 Аналіз комплексу лізоцим-спермідин, розрахованому у SwissDock

	Комплекс 1	Комплекс 2	Комплекс 3
Сайт зв'язування	MET:392, LEU:394, SER:393, TYR:528, ASN:644, ARG:465, ASN:640, LEU:642, GLU:354, VAL:350, THR:377, HSE:597, PHE:643, TYR:398, TYR:526	PHE:190, ASP:297, SER:184, VAL:11, LYS:296, LEU:298, ASP:60, ARG:121, SER:191, TYR:192, LYS:301, HSE:253, LEU:299, GLU:15, SER:12, SER:185	PRO:188, SER:193, GLN:295, LEU:299, GLU:15, SER:12, VAL:11, GLY:194, SER:191, SER:185, LEU:298, PHE:190
Типи зав'язків	Unfavorable	Unfavorable	Unfavorable

	Metal-Donor, Carbon Hydrogen Bond, Van der Waals, Hydrogen Bonds	Metal-Donor, Carbon Hydrogen Bond, Conventional Hydrogen Bond, Van der Waals, Hydrogen Bonds	Metal-Donor, Unfavorable Donor-Donor, Carbon Hydrogen Bond, Conventional Hydrogen Bond, Van der Waals, Hydrophobic Interactions, Hydrogen Bonds
Взаємодія з активним центром та біологічні наслідки	Взаємодія з MET:392 вказує на потенційний вплив на металозв'язуючий центр білка.	Взаємодія з ASP:60 та ARG:121 вказує на потенційний вплив на активний центр або доступність субстрату.	Взаємодія із залишками GLN:295 та LEU:299 вказує на потенційний опосередкований вплив на функцію білка.

Таблиця 2.8 Аналіз комплексу лізоцим-спермідин, розрахованому у PatchDock

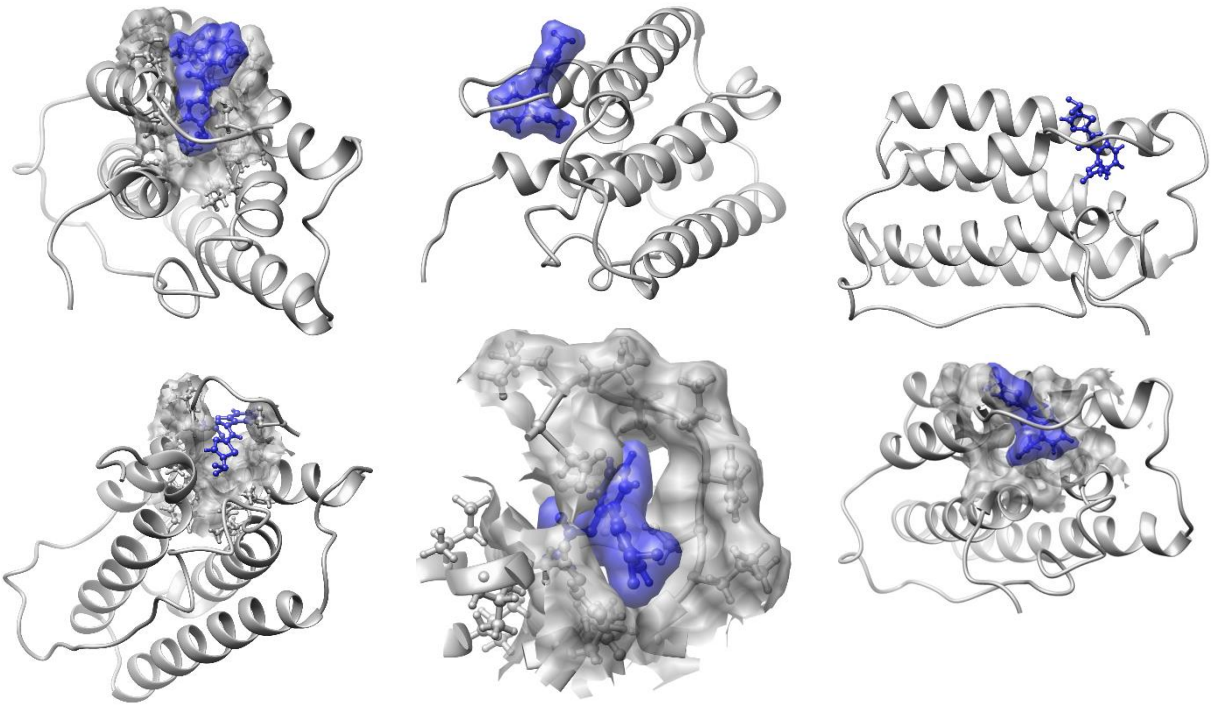
	Комплекс 1	Комплекс 2	Комплекс 3
Сайт зв'язування	THR:529, GLY:527, TYR:528, LYS:639, GLU:354,	SER:12, VAL:11, PRO:42, PHE:183, LEU:59, LEU:298,	ASP:60, ARG:121, PHE:183, PRO:42, PHE:190,

	ASN:640, VAL:350, TYR:526, GLY:530	GLU:15, PHE:63	SER:12, VAL:11, SER:184, PHE:63
Типи зав’язків	Van der Waals, Conventional Hydrogen Bond, Carbon Hydrogen Bond, Hydrophobic Interactions, Hydrogen Bonds	Van der Waals, Conventional Hydrogen Bond, Carbon Hydrogen Bond, Pi-Donor Hydrogen Bond, Hydrophobic Interactions, Hydrogen Bonds	Van der Waals, Conventional Hydrogen Bond, Carbon Hydrogen Bond, Hydrophobic Interactions, Hydrogen Bonds
Взаємодія з активним центром та біологічні наслідки	Взаємодія із залишками TYR:526 та GLU:354 вказує на потенційний вплив на функцію білка.	Близькість до залишків GLU:15 та PHE:63 вказує на потенційний вплив на активний центр або доступність субстрату.	Взаємодія з такими залишками, як ASP:60 та ARG:121, вказує на потенційний опосередкований вплив на функцію білка.

2.5 Інтерферон та нітазоксанід

2.5.1 SwissDock

Нітазоксанід переважно локалізується в межах однієї зони на інтерфероні α-2b (рис. 2.31).



Комплекс 1 Комплекс 2 Комплекс 3

Рис. 2.31 Візуалізація комплексів інтерферон-нітазоксанід з програми SwissDock за допомогою UCSF Chimera.

Детальна інформація щодо амінокислотних залишків та типів взаємодій зображена на рис. 2.32 та 2.33.

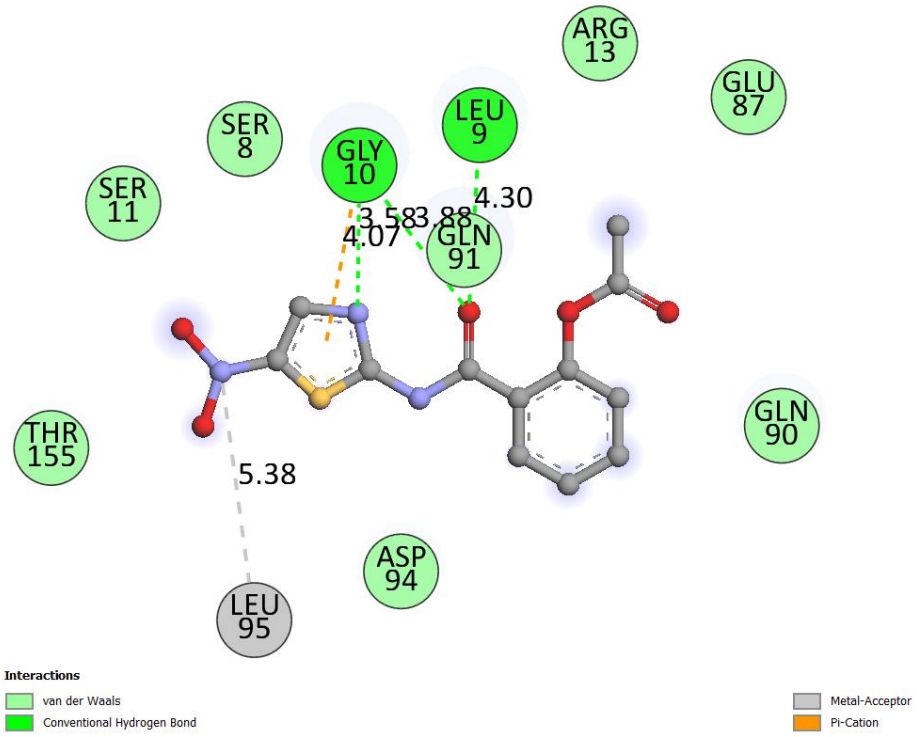
Аналіз стикування нітазоксаніду з інтерфероном альфа-2b з використанням Discovery Studio показано на рис. 2. 32.

Взаємодії Ван-дер-Ваальса з ASP:94, GLN:90 і GLU:87 мають вирішальне значення для стабілізації нітазоксаніду всередині сайту зв’язування. Звичайні водневі зв’язки з LEU:9 і GLY:10 вказують на специфічні та сильні взаємодії.

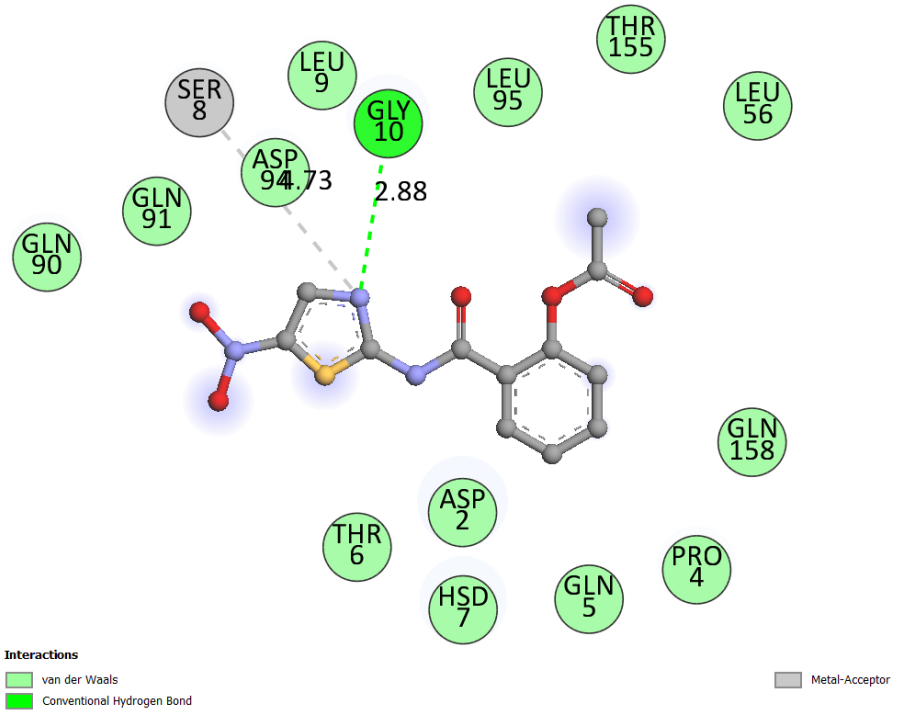
Взаємодії метал-акцептор (з LEU:95 та SER:8) та Pi-катіон (з GLY:10 та LEU:95) додають комплексу специфічність та стабільність. Ковалентний зв’язок з HSD:7 передбачає особливо сильну та специфічну взаємодію.

У цілому цей аналіз передбачає стабільну та специфічну взаємодію між нітазоксанідом та інтерфероном альфа-2b, що характеризується поєднанням

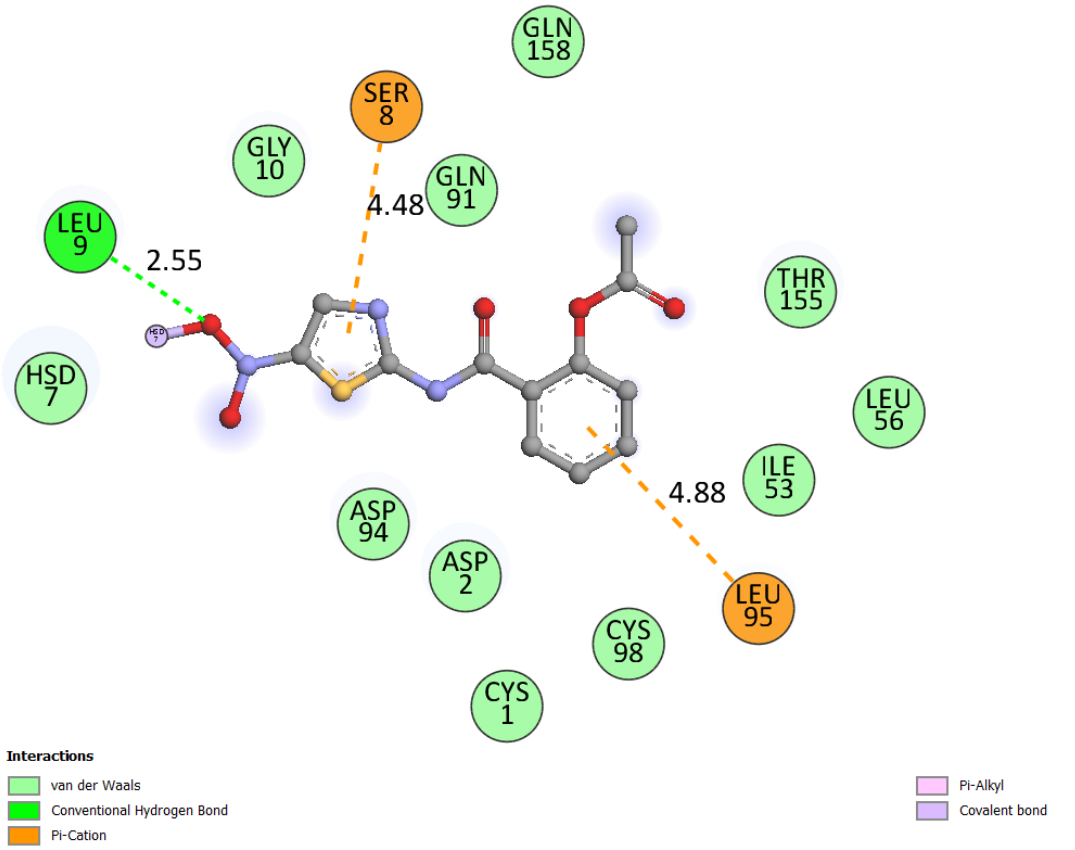
ван-дер-ваальсових, водневих зв’язків, метал-акцепторних, Pi-катіонних та ковалентних взаємодій.



Комплекс 1



Комплекс 2



Комплекс 3

Рис. 2.32 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів SwissDock інтерферон-нітазоксанід з у програмі BIOVIA Discovery Studio

Докінг-аналіз нітазоксаніду з інтерфероном альфа-2b за допомогою PLIP зображено на рис. 2.33.

Ключові залишки ARG:13, ASP:2, GLY:10, LEU:9 та ASP:94 неодноразово беруть участь у гідрофобних взаємодіях, водневих зв'язках між комплексами. Ці взаємодії свідчать про сильний і специфічний механізм зв'язування, за якого гідрофобні взаємодії, сприяють початковому позиціонуванню і стабілізації нітазоксаніду в сайті зв'язування, а водневі зв'язки надають додаткової специфічності та міцності взаємодії ліганд-білок.

Неодноразова участь цих залишків у різних взаємодіях у комплексах підкреслює їхню критичну роль у механізмі зв'язування.

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	13A	ARG	3.91	2714	182

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	9A	LEU	2.40	3.32	153.24	✓	✓	117 [Nam]	2711 [O2]
2	10A	GLY	2.30	3.17	145.21	✓	✓	136 [Nam]	2696 [N2]
3	94A	ASP	2.19	3.13	154.60	×	✓	2707 [Nam]	1529 [O3]

Комплекс 1

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	2A	ASP	3.61	2702	17

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	2A	ASP	3.01	3.76	138.16	✓	✓	22 [O3]	2715 [O2]
2	2A	ASP	2.09	3.02	150.67	×	✓	2707 [Nam]	22 [O3]
3	10A	GLY	2.88	3.69	138.83	✓	✓	136 [Nam]	2696 [N2]
4	94A	ASP	2.56	3.31	133.65	×	✓	2709 [O3]	1529 [O3]

Комплекс 2

Hydrophobic Interactions

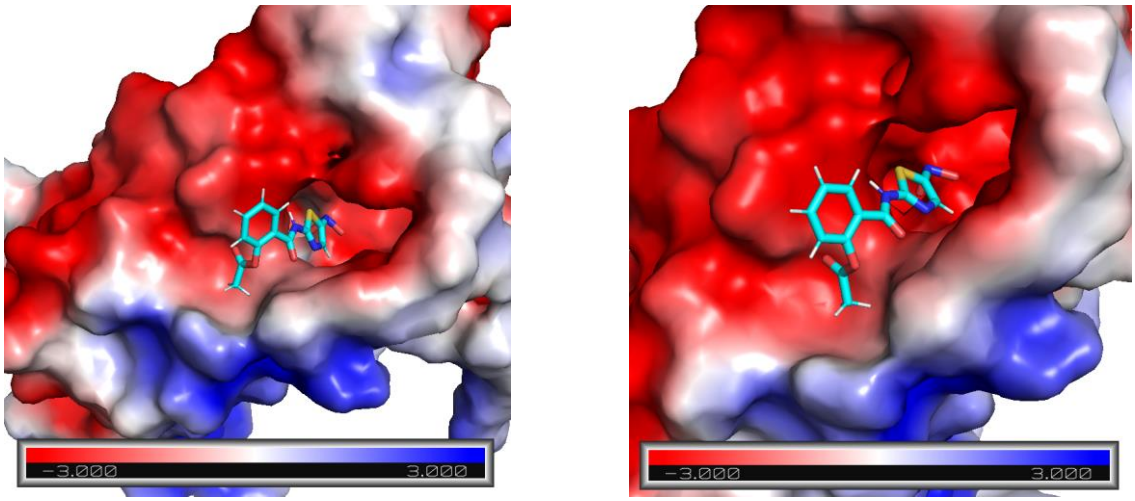
Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	2A	ASP	4.06	2701	17
2	94A	ASP	3.86	2701	1524
3	158A	GLN	4.70	2714	2563

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	2A	ASP	2.10	3.08	161.41	×	✓	2707 [Nam]	22 [O3]
2	9A	LEU	3.23	4.14	153.01	✓	✓	117 [Nam]	2696 [N2]
3	10A	GLY	2.80	3.65	143.75	✓	✓	136 [Nam]	2696 [N2]
4	94A	ASP	4.16	4.62	114.33	✓	✓	1529 [O3]	2711 [O2]

Комплекс 3

Рис. 2.33 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів SwissDock інтерферон-нітазоксанід з у програмі PLIP



А Б

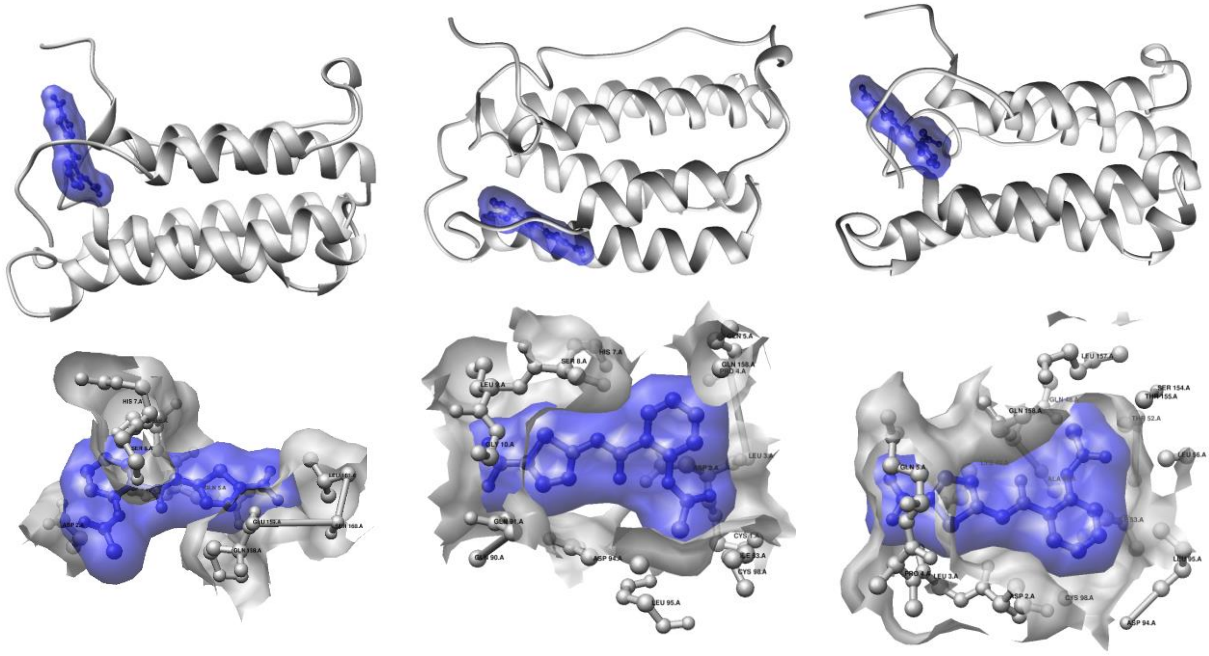
Рис. 2.34 Електростатичний потенціал на поверхні комплексу інтерферон-нітазоксанід з програми SwissDock (А) та чистого білка (Б).

Як видно з рисунку 2.34, сайт зв’язування має негативний електростатичний потенціал (амінокислоти ASP, GLN, GLU, SER, THR).

Зв’язування нітазоксаніду з білком не змінює розподіл електростатичного потенціалу.

2.5.2 PatchDock

Як і у випадку SwissDock, сайти зв’язування PatchDock зосереджені в одній зоні інтерферону (рис. 2.35).



Комплекс 1 Комплекс 2 Комплекс 3

Рис. 2.35 Візуалізація комплексів інтерферон-нітазоксанід з програми PatchDock за допомогою UCSF Chimera.

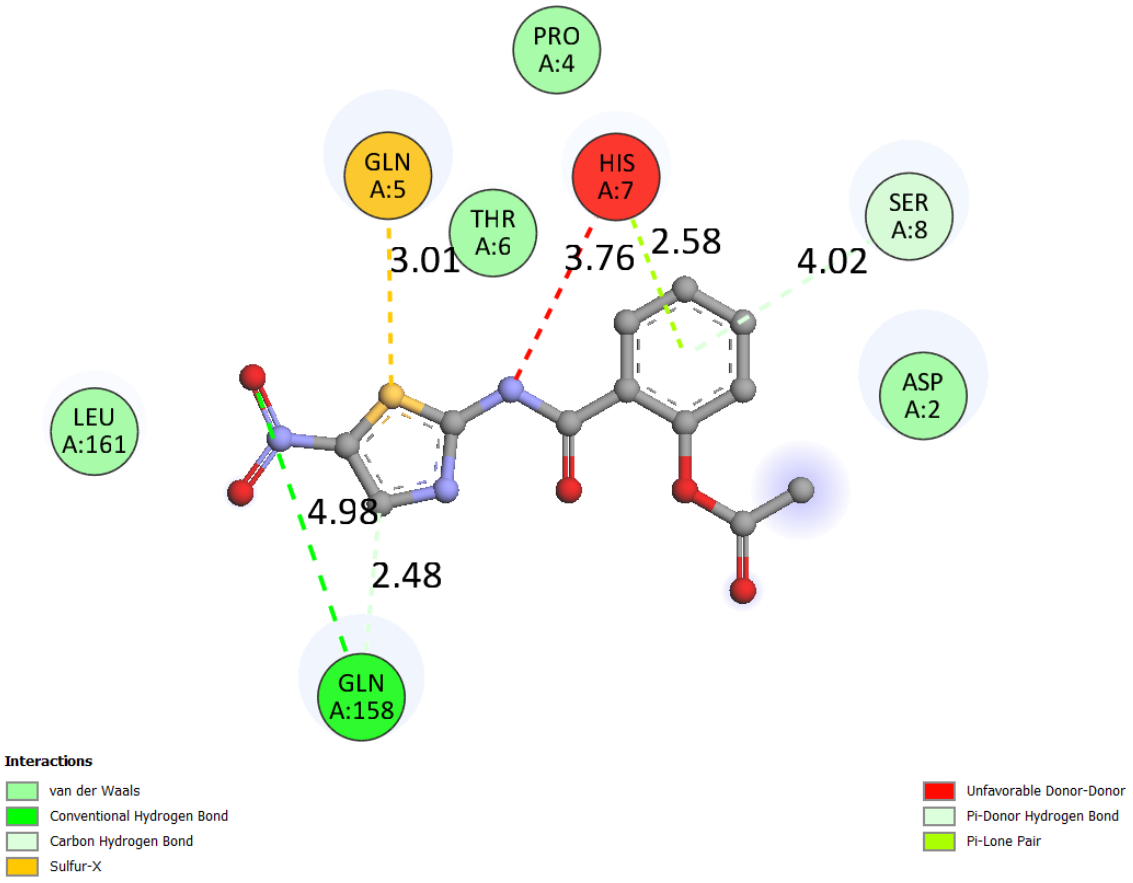
Проте молекула нітазоксаніду має різну орієнтацію в 3 комплексах, а типи взаємодій з однією амінокислотою (наприклад: ASP:2) різняться у 3-х комплексах (рис. 2.36, рис. 2.37).

Аналіз нітазоксаніду з інтерфероном альфа-2b у Discovery Studio зображено на рис. 2.36.

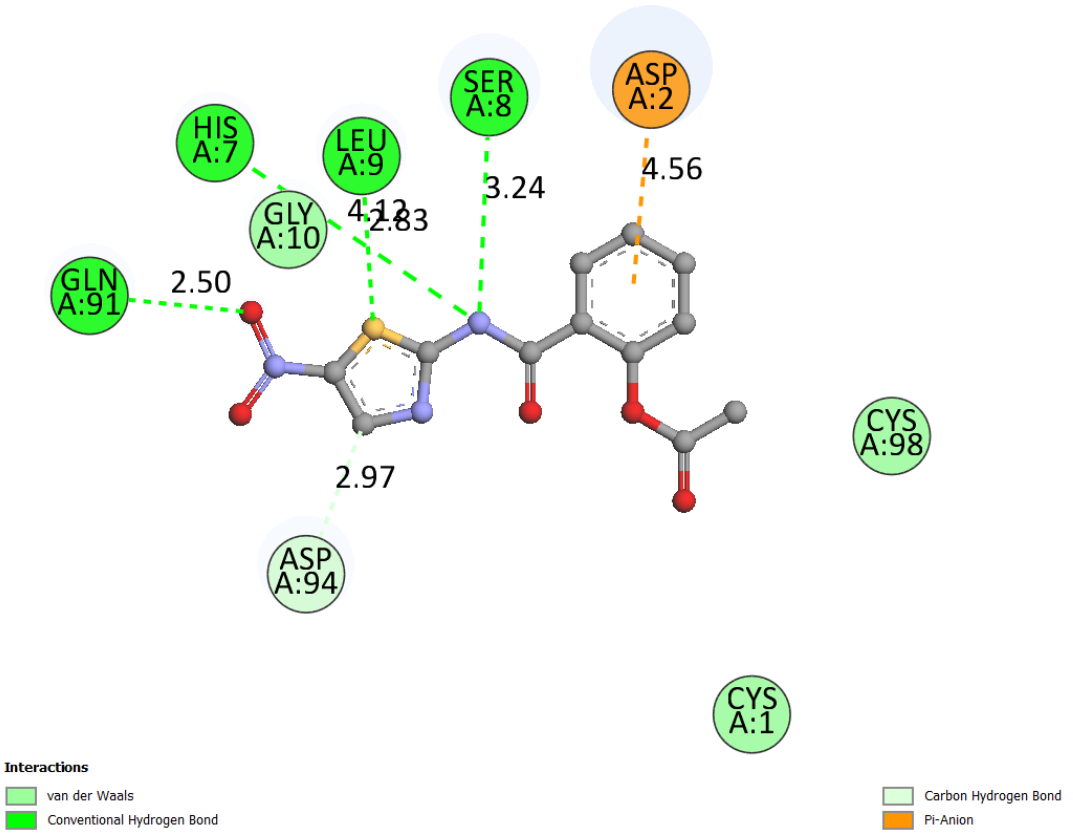
Взаємодії характеризуються поєднанням ван-дер-ваальсових сил, звичайних і вуглець- водневих зв’язків, а також унікальних взаємодій типу Sulfur-X, Pi-донорного водневого зв’язку, Pi-аніон, Pi-катіон, Pi-сигма і Pi-алкіл. У цих взаємодіях беруть участь такі ключові залишки, як LEU:161,

THR:6, PRO:4, ASP:2, GLN:158, CYS:98, GLY:10, GLN:91, HIS:7, LEU:9, SER:8, ASP:94, LYS:49, ILE:53 та інші.

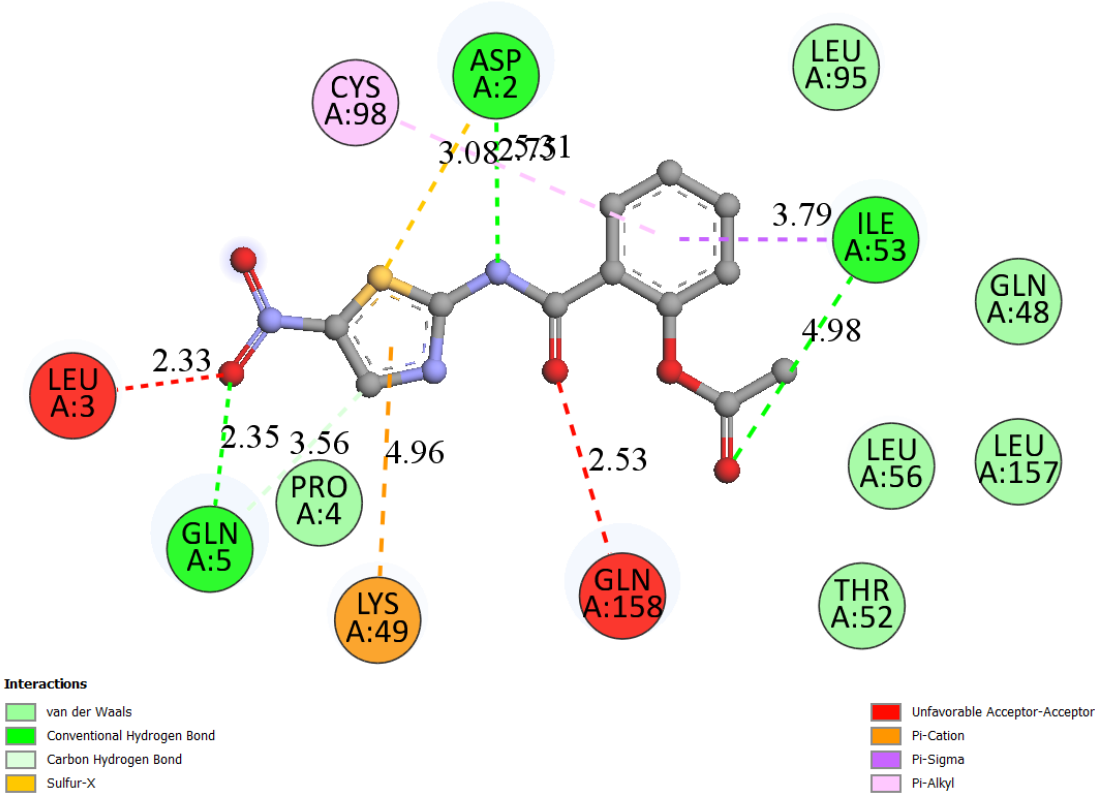
Ван-дер-ваальсові взаємодії забезпечують загальну стабілізацію, а водневі зв’язки – специфічні спрямовані взаємодії, необхідні для підтримання точної тривимірної структури комплексу. Взаємодія Sulfur-X і Pi-донорний водневий зв’язок, а також Pi-аніон, Pi-катіон, Pi-сигма і Pi-алкіл означають тонкі взаємодії, що можуть впливати на електронне оточення сайту зв’язування, впливаючи на орієнтацію і розташування нітазоксаніду в сайті зв’язування.



Комплекс 1



Комплекс 2



Комплекс 3

Рис. 2.36 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів PatchDock інтерферон-нітазоксанід з у програмі BIOVIA Discovery Studio

Докінг-аналіз нітазоксаніду з інтерфероном альфа-2b за допомогою PLIP зображено на рис. 2.37.

Взаємодії переважно включають гідрофобні та водневі зв'язки, а також Pi-катіонні. До ключових залишків, що беруть участь у цих взаємодіях, відносяться ASP:2, GLN:5, SER:2, GLN:91, THR:52, ILE:53, LEU:95, LEU:157 і LYS:49.

Гідрофобні взаємодії, особливо з ASP:2, відіграють важливу роль у стабілізації комплексу, сприяючи загальній структурній цілісності та позиціонуванню нітазоксаніду в сайті зв'язування. Водневі зв'язки за участю ASP:2, GLN:5, SER:2 і GLN:91 забезпечують специфічні спрямовані взаємодії, необхідні для підтримання точної тривимірної структури комплексу. Ці водневі зв'язки визначають специфічність і міцність зв'язування.

Взаємодія Pi-катіон з LYS:49 додає складності зв'язування, потенційно впливаючи на електронне оточення сайту зв'язування та орієнтацію нітазоксаніду.

Загалом, проведений аналіз показує складну взаємодію гідрофобних і водневих зв'язків, що доповнюються Pi-катіонними взаємодіями. Таке детальне розуміння типів взаємодії та залучених залишків дає цінні відомості для подальших досліджень і потенційного терапевтичного застосування.

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	2A	ASP	3.41	1369	11

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	2A	ASP	3.07	3.41	103.40	✓	✓	14 [O3]	1373 [O2]
2	5A	GLN	2.74	3.45	129.38	×	×	1359 [Nam]	33 [O2]

Комплекс 1

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	2A	ASP	2.93	1369	11

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	2A	ASP	2.22	2.95	129.39	✓	×	7 [Nam]	1373 [O2]
2	2A	ASP	2.48	2.99	114.61	✓	✓	14 [O3]	1363 [O2]
3	8A	SER	2.45	3.24	136.77	×	✓	1359 [Nam]	61 [O3]
4	91A	GLN	3.16	3.78	122.20	✓	✓	754 [Nam]	1355 [Nar]

Комплекс 2

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	2A	ASP	3.58	1366	11
2	52A	THR	3.49	1372	425
3	53A	ILE	3.28	1369	432
4	95A	LEU	3.33	1368	786
5	157A	LEU	3.25	1372	1281

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	2A	ASP	2.01	2.75	130.51	×	×	1359 [Nam]	10 [O2]

π-Cation Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Offset	Protein charged?	Ligand Group	Ligand Atoms
1	49A	LYS	4.96	1.03	✓	Aromatic	1353, 1354, 1355, 1356, 1357

Комплекс 3

Рис. 2.37 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів PatchDock інтерферон-нітазоксанід з у програмі PLIP

2.5.3 Висновки

Аналіз молекулярного докінгу з використанням SwissDock та PatchDock надав багатогранне уявлення про потенційні взаємодії між нітазоксанідом та інтерфероном альфа-2b. Результати обох платформ, хоч і не повністю

збігаються, дають цінну інформацію про сайти зв’язування та можливий вплив на функцію білка.

Результати стикування не завжди відображають взаємодію з конкретним залишком активного сайту як у SwissDock, так і в PatchDock. Однак деякі залишки, такі як ASP:2 і GLN:158, періодично беруть участь у різних кластерах в обох дослідженнях докінгу. Тобто нітазоксанід може впливати на конформацію або динаміку цих залишків, які можуть модулювати функцію інтерферону α-2b.

За допомогою SwissDock і PatchDock визначено спектр типів взаємодії, включаючи сили Ван-дер-Ваальса, водневі зв’язки та гідрофобні взаємодії, які сприяють стабільності та специфічності позиції стикування. Примітно, що результати PatchDock виявили взаємодії, пов’язані з сіркою, які не були такими помітними в результатах SwissDock, можливо, через різні функції оцінки та алгоритми, що використовуються двома платформами.

Взаємодія з CYS:98 та ASP:2 – критично важливими амінокислотами для структурної цілісності та функцій інтерферону α-2b, дозволяють припустити, що нітазоксанід потенційно може впливати на активність білка. Враховуючи вирішальну роль інтерферону альфа-2b в імунній відповіді, ці взаємодії викликають стурбованість щодо потенційного впливу нітазоксаніду на біологічну роль білка, особливо з урахуванням його терапевтичного застосування. Відмінності, що спостерігаються в типах взаємодії та залишках, наголошують на важливості використання кількох обчислювальних підходів для більш повного розуміння взаємодій ліганд-білок.

Таким чином, дослідження докінгу показують, що взаємодія нітазоксаніду з інтерфероном альфа-2b може впливати на його функцію. Точні наслідки цих взаємодій не зрозумілі і потребують подальшого експериментального дослідження.

Узагальнену інформацію про взаємодії представлено у таблицях 2.9 та 2.10.

Таблиця 2.9 Аналіз комплексу інтерферон-нітозаксонід, розрахованому у SwissDock

	Комплекс 1	Комплекс 2	Комплекс 3
Сайт зв’язування	ASP:94, GLN:90, GLU:87, ARG:13, SER:8, SER:11, THR:155, LEU:9, GLY:10	THR:6, ASP:2, HSD:7, GLN:5, PRO:4, GLN:158, LEU:56, THR:155, LEU:95, LEU:9, ASP:94, GLN:91, GLN:90	ASP:94, ASP:2, CYS:1, CYS:98, ILE:53, LEU:56, THR:155, GLN:91, GLN:158, GLY:10, HSD:7
Типи зав’язків	Van der Waals, Conventional Hydrogen Bond, Metal-Acceptor, Pi-Cation, Hydrophobic Interactions, Hydrogen Bonds	Van der Waals, Conventional Hydrogen Bond, Metal-Acceptor, Hydrophobic Interactions, Hydrogen Bonds	Van der Waals, Conventional Hydrogen Bond, Pi-Cation, Covalent bond, Hydrophobic Interactions, Hydrogen Bonds
Взаємодія з активним центром та біологічні наслідки	Взаємодія з ASP:94 може потенційно впливати на стабільність білка через близькість до CYS:98.	Взаємодія з ASP:94 може потенційно впливати на стабільність білка через близькість до CYS:98.	Взаємодія з CYS:1 та CYS:98 може порушити основні дисульфідні зв’язки, впливаючи на стабільність білка.

Таблиця 2.10 Аналіз комплексу інтерферон -нітозаксонід, розрахованому у PatchDock

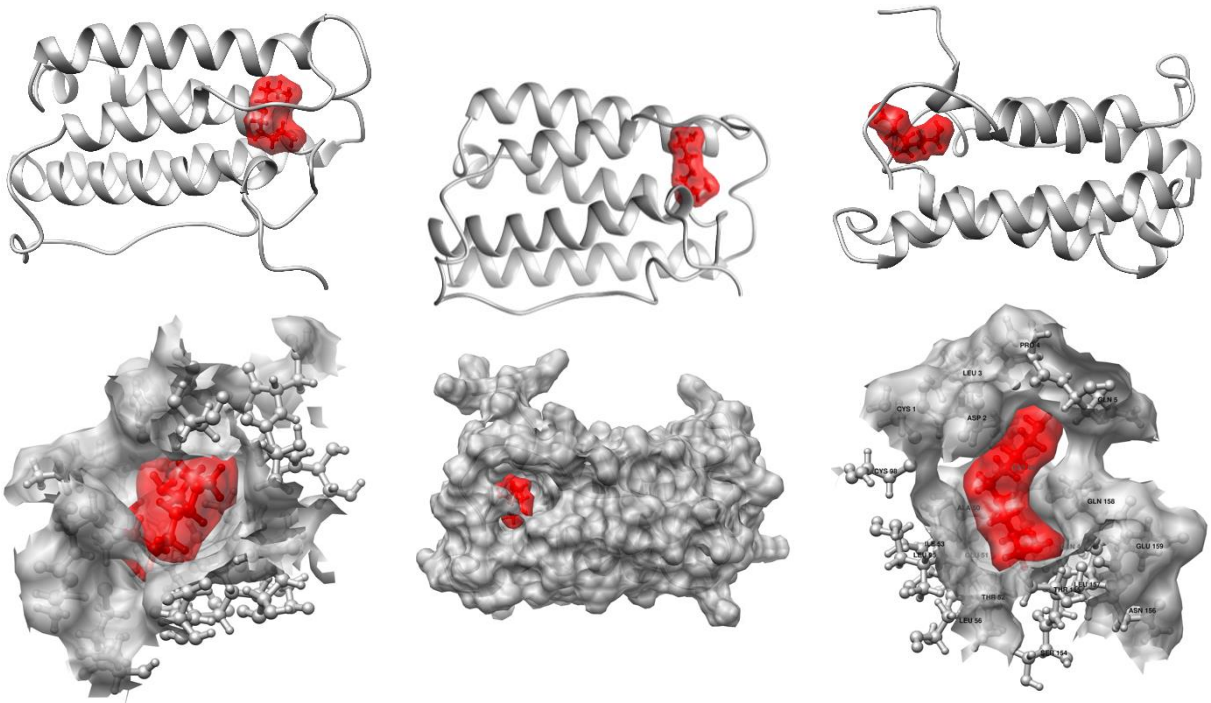
	Комплекс 1	Комплекс 2	Комплекс 3
Сайт зв’язування	LEU:161, THR:6, PRO:4, ASP:2, GLN:158, GLN:5, HIS:7, SER:8	LEU:161, THR:6, PRO:4, ASP:2, GLN:158, GLN:5, HIS:7, SER:8	ASP:2, LEU:3, GLN:158, LYS:49, ILE:53, CYS:98, LEU:56, THR:52, LEU:157, GLN:48, LEU:95
Типи зав’язків	Van der Waals, Hydrogen Bonds (Conventional, Carbon, Pi-Donor), Sulfur-X, Unfavorable Donor-Donor, Pi-Lone Pair, Hydrophobic Interactions	Van der Waals, Hydrogen Bonds (Conventional, Carbon, Pi-Donor), Sulfur-X, Unfavorable Donor-Donor, Pi-Lone Pair, Hydrophobic Interactions	Van der Waals, Hydrogen Bonds (Conventional, Carbon), Sulfur-X, Unfavorable Acceptor-Acceptor, Pi-Interactions (Cation, Sigma, Alkyl), Hydrophobic Interactions
Взаємодія з активним центром та біологічні наслідки	Зв’язування нітазоксаніду з ASP:2 та GLN:158 може впливати на взаємодію білка з рецептором або на його	Зв’язування нітазоксаніду з ASP:2 та GLN:158 може впливати на взаємодію білка з рецептором або на його	Взаємоді з CYS:98 є важливою через його роль у формуванні дисульфідних зв’язків, які є критично важливими для

	противірусну активность.	противірусну активность.	стабільності білка. Взаємодія в цьому місці може потенційно порушити структуру білка.

2.6 Інтерферон та спермідин

2.6.1 SwissDock

Спермідин локалізуються переважно в межах одного сайту зв’язування на інтерфероні. (рис. 2.38).



Комплекс 1 Комплекс 2 Комплекс 3

Рис. 2.38 Візуалізація комплексів лактоферин-спермідин з програми SwissDock за допомогою UCSF Chimera.

Проте різним комплексам відповідають різні типи взаємодій для однакових амінокислот (рис. 2.39 та 2.40).

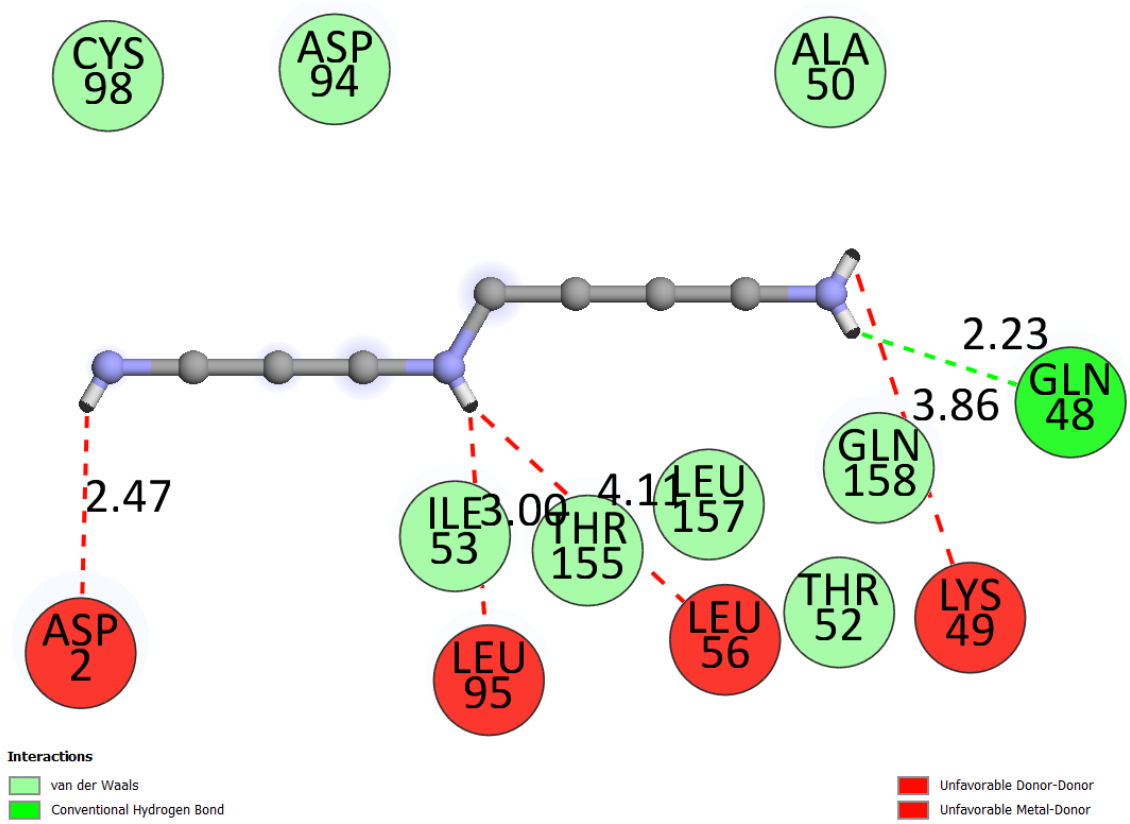
Аналіз стикування спермідину з інтерфероном альфа-2b з використанням Discovery Studio зображено на рис. 2.39.

Взаємодії характеризуються поєднанням сил Ван-дер-Ваальса, звичайних водневих зв’язків, вуглець-водневих зв’язків та несприятливих взаємодій метал-донор. Ключові залишки, що беруть участь у цих взаємодіях, включають ILE:53, THR:155, LEU:157, THR:52, GLN:158, CYS:98, ASP:94, ALA:50, LEU:95, LYS:49, LEU :56. , SER:8, SER:154, GLN:48, CYS:1, PRO:4 та GLN:5.

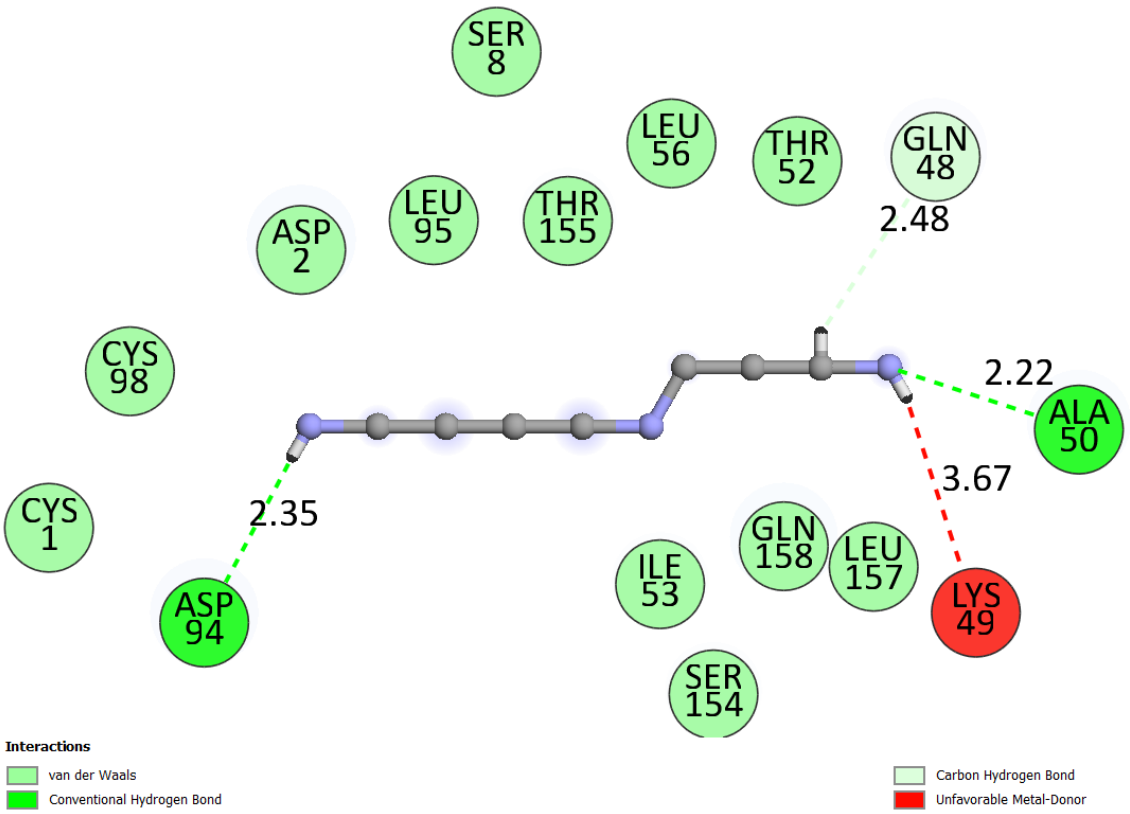
Взаємодії Ван-дер-Ваальса, особливо з ILE:53, THR:155 та LEU:157, відіграють значну роль у стабілізації комплексу, сприяючи загальній структурній цілісності та позиціонуванню спермідину всередині сайту зв’язування. Звичайні водневі зв’язки з GLN:48, ASP:94 і ALA:50 забезпечують специфічні спрямовані взаємодії, необхідні для підтримки точної тривимірної структури комплексу білок-ліганд.

Наявність вуглець-водневих зв’язків та несприятливих взаємодій метал-донор (з ASP:2 та LYS:49), ускладнюють профіль взаємодій. Ці взаємодії можуть впливати на електронне оточення сайту зв’язування та орієнтацію спермідину.

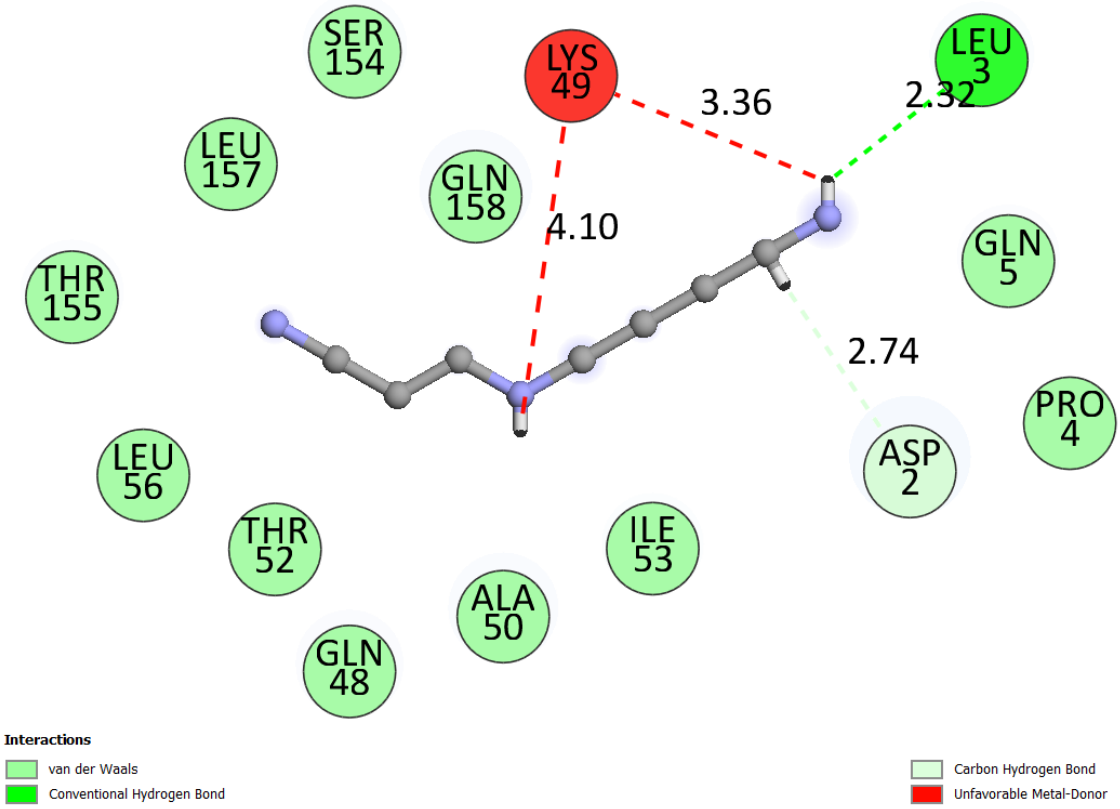
Всі взаємодії в сукупності сприяють динамічному та специфічному зв’язуванню спермідину з інтерфероном альфа-2b.



Комплекс 1



Комплекс 2



Комплекс 3

Рис. 2.39 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів SwissDock інтерферон-спермідин з у програмі BIOVIA Discovery Studio

Аналіз докінгу спермідину з інтерфероном альфа-2b у PLIP зображено на рисунку 2.40.

Водневі зв’язки найбільш помітні (ASP:2, ALA:50 та GLN:158). Ці зв’язки є важливими для підтримки структурної цілісності та належного вирівнювання спермідину в межах сайту зв’язування.

Гідрофобна взаємодія з THR:52 сприяє неполярним взаємодіям всередині комплексу. Ця взаємодія важлива для загальної конформації та стабільності комплексу, доповнюючи водневі зв’язки.

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	2A	ASP	3.22	4.10	147.31	✓	✓	13 [Nam]	2695 [N3]
2	2A	ASP	3.36	3.91	115.00	×	✓	2695 [N3]	24 [O2]
3	50A	ALA	2.16	3.15	171.27	✓	✓	803 [Nam]	2704 [N3]
4	158A	GLN	2.30	3.27	157.25	×	✓	2704 [N3]	2570 [O3]

Комплекс 1

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	2A	ASP	3.09	3.97	148.48	✓	✓	13 [Nam]	2704 [N3]
2	2A	ASP	2.52	3.44	167.92	✓	✓	22 [O3]	2704 [N3]
3	50A	ALA	2.22	3.19	164.46	✓	✓	803 [Nam]	2695 [N3]
4	94A	ASP	2.35	3.35	167.64	×	✓	2704 [N3]	1531 [O2]
5	158A	GLN	2.11	3.08	159.54	×	✓	2695 [N3]	2570 [O3]
6	158A	GLN	3.16	3.81	123.03	×	✓	2699 [N3]	2570 [O3]

Комплекс 2

Hydrophobic Interactions

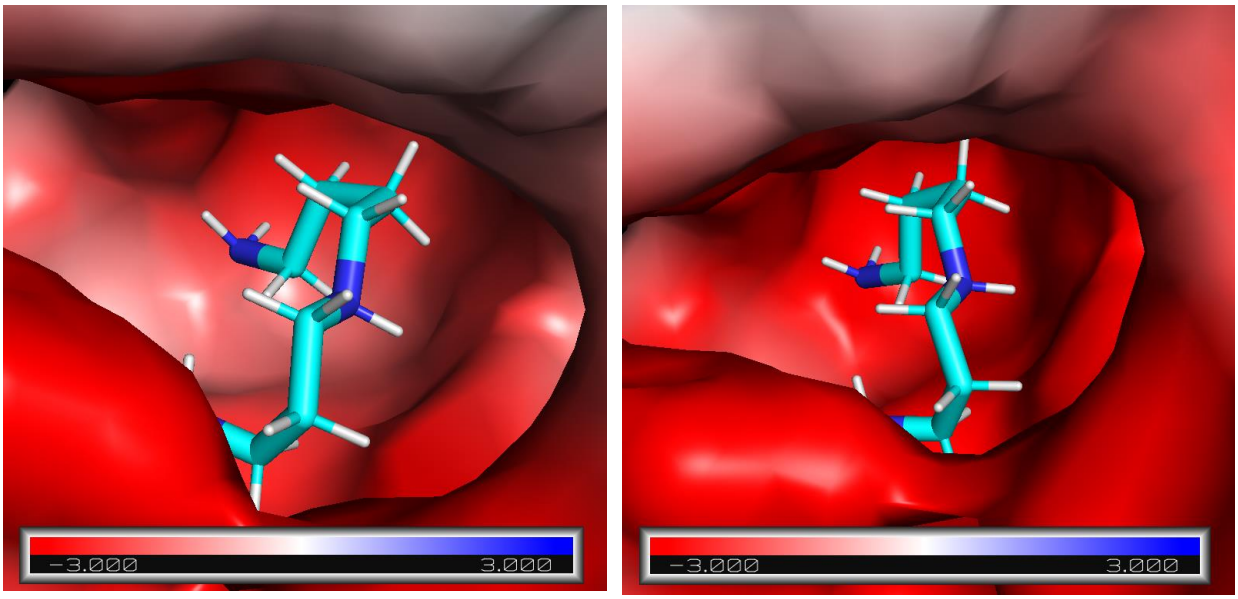
Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	52A	THR	3.88	2697	836

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	3A	LEU	2.32	3.11	133.07	×	✓	2704 [N3]	43 [O2]
2	50A	ALA	2.80	3.66	145.44	✓	✓	803 [Nam]	2699 [N3]
3	158A	GLN	3.27	3.89	121.66	✓	✓	2559 [Nam]	2695 [N3]
4	158A	GLN	2.47	3.40	151.26	×	✓	2699 [N3]	2570 [O3]

Комплекс 3

Рис. 2.40 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів SwissDock інтерферон-спермідин з у програмі PLIP



А Б

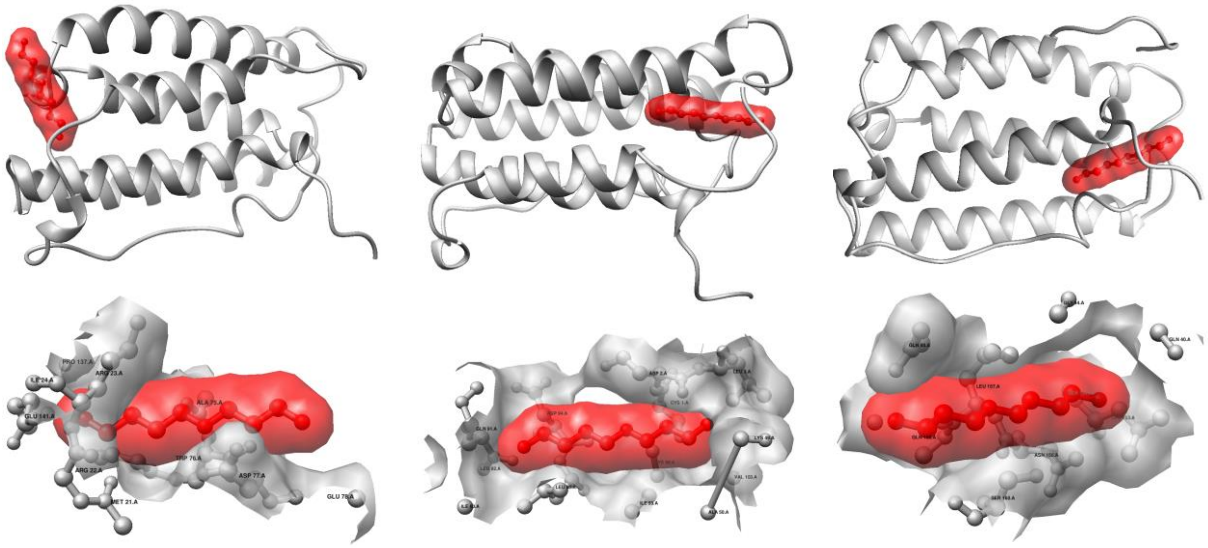
Рис. 2.41 Електростатичний потенціал на поверхні комплексу інтерферон-спермідин з програми SwissDock (А) та чистого білка (Б).

Електростатичне дослідження комплексу інтерферон- спермідин зображено на рис. 2.41. Як видно, кишеня зв’язування має негативний потенціал, що

узгоджується з амінокислотними залишками (полярна негативно заряджена ASP, полярні SER, THR, GLN). Після зв’язування електростатичний потенціал кишені майже не змінюється.

2.6.2 PatchDock

На відміну від SwissDock всі 3 комплекси відображають різні сайти зв’язування спермідину на інтерфероні (рис. 2.42).



Комплекс 1 Комплекс 2 Комплекс 3

Рис. 2.42 Візуалізація комплексів інтерферон-спермідин з програми PatchDock за допомогою UCSF Chimera.

Результати PatchDock передбачають меншу кількість взаємодіючих амінокислот та типів взаємодій (рис. 2.43, рис. 2.44).

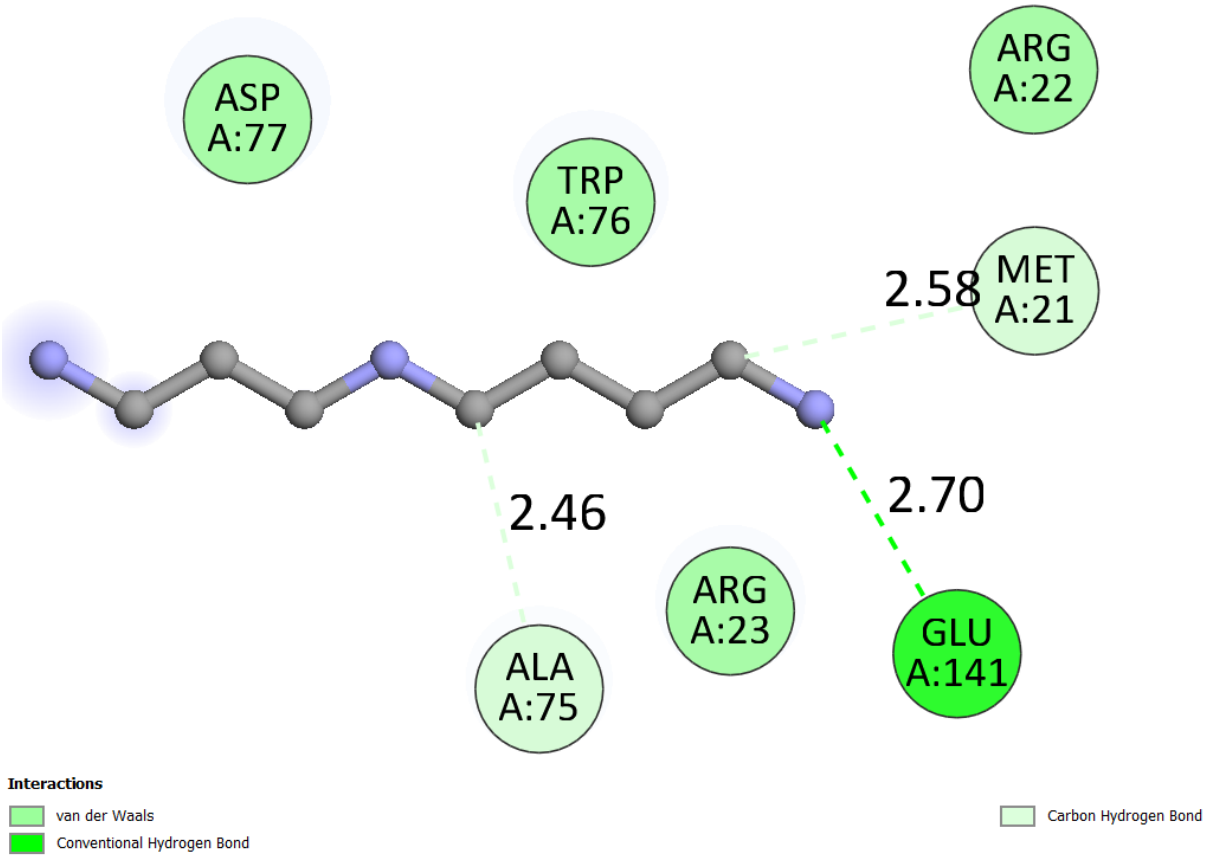
Аналіз стикування спермідину з інтерфероном альфа-2b, проведений у Discovery Studio, зображений на рисунку 2.43.

Ван-дер-Ваальсові взаємодії з ARG:23, ARG:22, TRP:76, ASP:77, LEU:3, CYS:1, CYS:98, ASP:94, LEU:95, ILE: 53, SER:160 , LEU:157 та ASN:156 відіграють вирішальну роль у процесі молекулярної взаємодії. Вони сприяють загальній комплементарності форми між спермідином та місцем зв’язування, сприяючи щільному та стабільному приляганню.

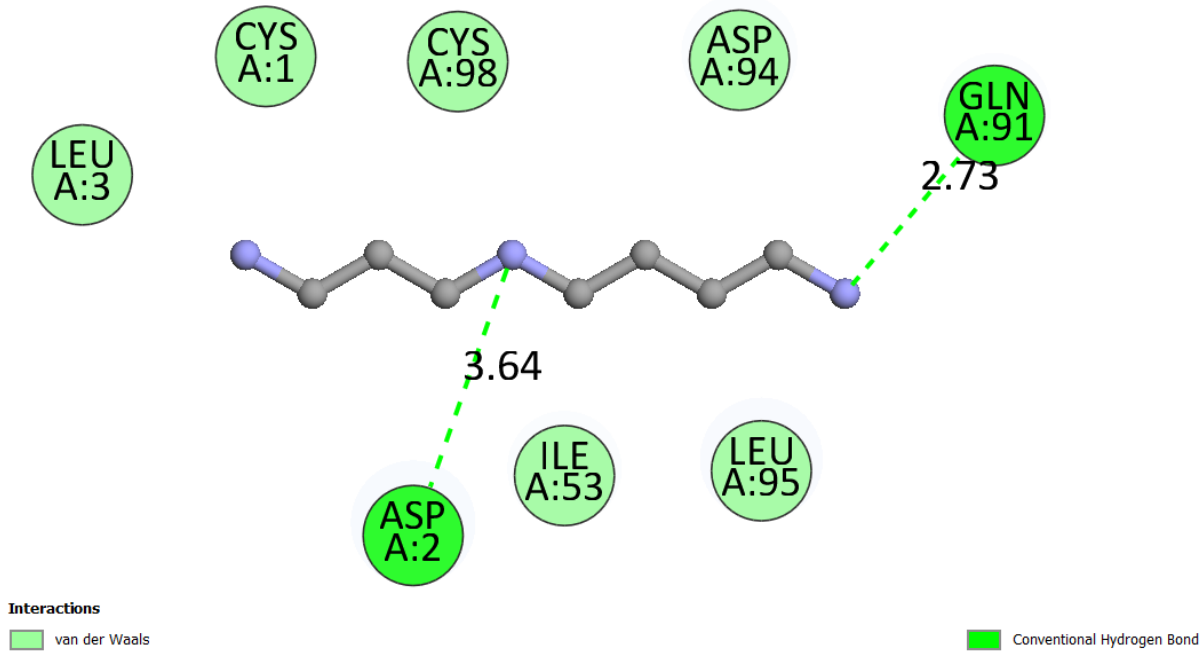
Звичайні водневі зв’язки з GLU:141, ASP:2, GLN:91 і GLU:48 необхідні для підтримки структурної цілісності і орієнтації спермідину всередині сайту зв’язування.

Вуглець-водневі зв’язки з ALA:75, MET:21 та LEU:153, хоча більш слабкі, ніж звичайні водневі, відіграють значну роль у стабілізації комплексу і афінності зв’язування.

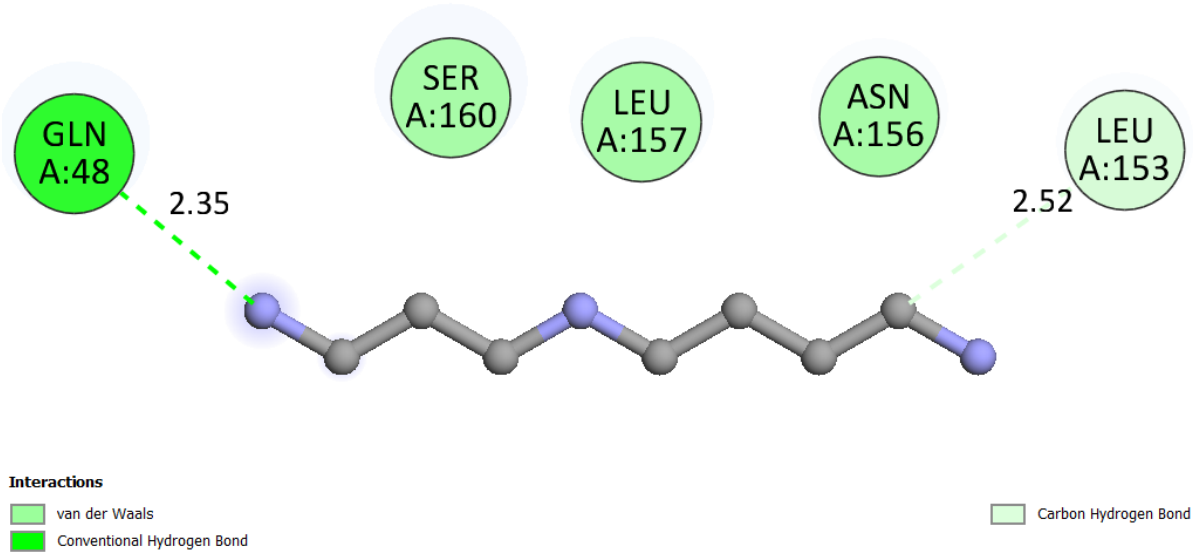
Комбінація сил Ван-дер-Ваальса, водневих зв’язків та вуглець-водневих зв’язків створює стабільне та специфічне середовище зв’язування.



Комплекс 1



Комплекс 2



Комплекс 3

Рис. 2.43 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів PatchDock інтерферон-спемідин з у програмі BIOVIA Discovery Studio

Аналіз стикування спермідину з інтерфероном альфа-2b за допомогою PLIP зображено на рис. 2.44.

Гідрофобні взаємодії з ARG:23, TRP:76, ASP:77, ASP:2, ASP:94, LEU:95, GLN:48, ASN:156 та LEU:157 необхідні для правильного позиціонування

спермідину всередині сайту зв’язування та можуть впливати на загальну конформацію комплексу білок-ліганду.

Водневі зв’язки з ARG:23, TRP:76, ASP:77, GLU:141, ASP:2, LEU:95, LEU:153, ASN:156, LEU:157 та SER:160 мають значення для специфічності та міцності зв’язування.

Поєднання гідрофобних та водневих зв’язків відіграє значну роль у формуванні стабільного та специфічного комплексу.

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	23A	ARG	2.82	1360	178
2	76A	TRP	3.13	1360	615
3	77A	ASP	3.38	1355	625

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	23A	ARG	2.38	2.93	114.71	✓	×	174 [Nam]	1362 [N3]
2	76A	TRP	2.83	3.42	117.03	×	×	1357 [N3]	610 [O2]
3	76A	TRP	3.58	4.06	111.29	×	×	1353 [N3]	610 [O2]
4	77A	ASP	3.39	4.04	127.84	✓	✓	628 [O3]	1353 [N3]
5	141A	GLU	2.93	3.87	153.00	×	✓	1362 [N3]	1157 [O2]

Комплекс 1

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	2A	ASP	3.65	1355	11
2	94A	ASP	3.75	1360	775
3	95A	LEU	2.71	1360	786

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	2A	ASP	2.63	3.55	156.11	✓	×	7 [Nam]	1357 [N3]
2	2A	ASP	1.85	2.64	131.33	×	×	1353 [N3]	10 [O2]
3	95A	LEU	3.43	3.84	107.40	✓	×	779 [Nam]	1362 [N3]

Комплекс 2

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	48A	GLN	3.59	1355	392
2	156A	ASN	3.61	1360	1273
3	157A	LEU	3.09	1359	1283

Hydrogen Bonds

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	153A	LEU	2.52	2.92	102.73	×	×	1362 [N3]	1251 [O2]
2	156A	ASN	2.33	3.32	175.95	✓	✓	1276 [Nam]	1362 [N3]
3	157A	LEU	3.59	4.05	110.10	×	×	1353 [N3]	1280 [O2]
4	160A	SER	3.66	4.04	106.62	✓	✓	1308 [O3]	1357 [N3]

Комплекс 3

Рис. 2.44 Аналіз типів взаємодій та відстаней для трьох комплексів PatchDock інтерферон-спермідин з у програмі PLIP

2.6.3 Висновки

Аналіз молекулярного докінгу з використанням SwissDock і PatchDock виявив потенційні взаємодії між спермідином та інтерфероном альфа-2b, надавши уявлення про динаміку зв’язування та можливий вплив на функцію білка. Результати обох платформ, незважаючи на використання різних алгоритмів та функцій оцінки, сходяться у кількох ключових моментах, які передбачають значний вплив спермідину на біологічну активність інтерферону альфа-2b.

Результати стикування SwissDock та PatchDock показують, що спермідин взаємодіє з залишками, які мають вирішальне значення для активності інтерферону альфа-2b. Примітно, що такі залишки, як GLU:141 та ASP:2, періодично беруть участь у різних кластерах, що дозволяє припустити, що спермідин може впливати на конформацію або динаміку цих залишків, потенційно модулюючи функцію білка.

Обидва сервіси визначили різні типи взаємодій, включаючи сили Ван-дер-Ваальса, водневі зв’язки, гідрофобні взаємодії і навіть несприятливі взаємодії метал-донор. Ці взаємодії сприяють стабільності та специфічності сайтів зв’язування та вказують на те, що спермідин може мати безліч точок впливу на структуру білка.

Взаємодія з участю залишків, критично важливих для структурної цілісності та функції інтерферону альфа-2b, таких як CYS:98 та GLU:141, дозволяють припустити, що спермідин потенційно може впливати на активність білка. Враховуючи важливу роль інтерферону альфа-2b в імунній відповіді, ці взаємодії наголошують на важливості розуміння потенційного впливу спермідину на біологічну роль білка, особливо в контексті його терапевтичного застосування. Точні біологічні наслідки цих взаємодій ще доведеться з’ясувати та вимагають подальшого експериментального дослідження.

Інтеграція результатів обох платформ наголошує на важливості використання кількох обчислювальних підходів для отримання повного розуміння взаємодій ліганд-білок.

Узагальнену інформацію про взаємодії представлено у таблицях 2.11 та 2.12.

Таблиця 2.11 Аналіз комплексу інтерферон-спермідин, розрахованому у SwissDock

	Комплекс 1	Комплекс 2	Комплекс 3
Сайт зв’язування	ILE:53, THR:155, LEU:157, THR:52, GLN:158, CYS:98, ASP:94, ALA:50	CYS:1, CYS:98, ASP:2, LEU:95, SER:8, THR:155, LEU:56, THR:52, LEU:157, GLN:158, ILE:53, SER:154	LEU:56, THR:52, GLN:48, ALA:50, ILE:53, PRO:4, GLN:5, GLN:158, SER:154, LEU:157, THR:155
Типи зав’язків	Van der Waals, Hydrogen Bonds (Conventional), Unfavorable Donor-Donor, Unfavorable Metal-Donor	Van der Waals, Hydrogen Bonds (Conventional), Unfavorable Metal-Donor, Carbon Hydrogen Bond	Van der Waals, Hydrogen Bonds (Conventional), Unfavorable Metal-Donor, Hydrophobic Interaction
Взаємодія з активним центром та біологічні наслідки	Взаємодія з ASP:94 та CYS:98 може впливати на стабільність білка.	Взаємодія з ASP:2 та близькість до CYS:98 може впливати на функцію та стабільність білка.	Взаємодія з CYS:1 та CYS:98 може порушити основні дисульфідні зв’язки, впливаючи на стабільність

			білка.

Таблиця 2.12 Аналіз комплексу інтерферон-спермідин, розрахованому у PatchDock

	Комплекс 1	Комплекс 2	Комплекс 3
Сайт зв’язування	ARG:23, ARG:22, TRP:76, ASP:77, GLU:141, ALA:75, MET:21	LEU:3, CYS:1, CYS:98, ASP:94, LEU:95, ILE:53, ASP:2, GLN:91	SER:160, LEU:157, ASN:156, GLU:48, LEU:153
Типи зав’язків	Van der Waals, Hydrogen Bonds (Conventional, Carbon), Hydrophobic	Van der Waals, Hydrogen Bonds (Conventional), Hydrophobic	Van der Waals, Hydrogen Bonds (Conventional), Hydrophobic
Взаємодія з активним центром та біологічні наслідки	Взаємодія з GLU:141 може впливати на функцію білка через його роль в активному центрі.	Взаємодія з ASP:2 та CYS:98 може впливати на функцію та стабільність білка.	Взаємодія з GLU:48 може впливати на активність та стабільність білка.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 2

У результаті досліджень було проведено докінг для 6 кобмінацій ліганд-білок, а саме з лігандів – нітазоксанід та спермідин, з білків – лізоцим, лактоферин та інтерферон-альфа-2b.

Сервіси SwissDock та PatchDock гарно зарекомендували себе для використання як взаємодоповнюючих сервісів моделювання молекулярного стикування. Їх результати добре корелювали, а відмінності допомогли більш широко розібрати картину міжмолекулярних взаємодій. Головною особливістю є різні методи та параметри, що використовують у сервісах. Проте попри це були отримані споріднені результати, що підвищує рівень довіри. Головним обмеженням PathcDock є постулат незмінності форми ліганда під час моделювання, що добре видно на рисунках візуалізації, особливо у порівнянні з SwissDock. Це (та інші відмінності у алгоритмах) зумовлюють неможливість визначення зміни електростатичного потенціалу звужуючої кишені.

Discovery Studio та PLIP також взаємодоповнювали результати одне одного, що знову ж таки підвищує довіру до кожного сервісу. Проте, за результатами очевидно, що DS більш потужний застосунок, оскільки виявляє ширший спектр взаємодій з більшою кількістю амінокислотних залишків.

Взаємодія нітазоксаніду з лізоцимом опосередкована, головним чином, амінокислотами GLU:35, ASP:53, ALA:108, TRP:109, GLN:58, VAL:110, та ASN:60. Основні типи взаємодій між нітазоксанідом і лізоцимом охоплюють ван-дер-ваальсові зв'язки, Pi-Anion, Pi-Alkyl взаємодії, звичайні водневі зв’язки, а також специфічні взаємодії, такі як Pi-Pi stacking та Pi-Sulfur. Вплив на активний центр лізоциму зумовлений сильною специфічністю нітазоксаніду до взаємодії з GLU:35, який є ключовим залишком у активному центрі лізоциму. Ця взаємодія може безпосередньо модулювати ферментативну активність лізоциму. Крім того, близькість ліганду до ASP:53 може мати потенційні непрямі ефекти на доступність або функціональність активного центру.

На основі результатів докінгу комплексу лізоцим-спермідин можна виділити ключові залишки ALA:108, TRP:109, ASN:60, LYS:1, ARG:115, ASN:114 та TYR:124. Спостерігається широкий спектр типів взаємодій, включаючи ван-дер-ваальсові, звичайні водневі, вуглець-водневі зв’язки та Pi-взаємодії. Водневі зв'язки виступають як домінуюча сила. Пряма взаємодія спермідину з GLU:35 та його близькість до ASP:53 спостерігаються у кількох комплексах, що вказує на потенційний прямий та/або опосередкований вплив на активний центр лізоциму.

У взаємодії між нітазоксанідом і лактоферином ключовими амінокислотними залишками є GLU:354, ASN:640, TYR:526, VAL:11, LEU:299 та ARG:587. Основні типи взаємодій включають ван-дер-ваальсові, звичайні водневі зв'язки, Pi-аніонні та Pi-катіонні взаємодії. Ці взаємодії вказують на потенційний вплив нітазоксаніду на активний центр лактоферину, який може включати алостеричні або ортостеричні ефекти, впливаючи на доступність субстрату та модуляцію функції білка.

Ключові взаємодії між спермідином і лактоферином опосередковані в основному залишками ASP:60 і ARG:121, які важливі для його функцій зв'язування заліза та карбонат-іонів. Це вказує на потенційний вплив спермідину на ці критичні функціональні ділянки лактоферину. Основні типи взаємодій включають ван-дер-ваальсові сили, звичайні водневі зв'язки та вуглець-водневі зв'язки, при цьому PatchDock також виявляє гідрофобні взаємодії.

Молекулярний докінг нітазоксаніду з інтерфероном альфа-2b вказує на взаємодію з ключовими залишками ASP:2 і GLN:158. Ці взаємодії (сили Ван-дер-Ваальса, водневі зв'язки та гідрофобні взаємодії) мають потенціал впливати на конформацію та динаміку цих важливих залишків. Особливо примітними є взаємодії з CYS:98 та ASP:2, які є критично важливими для структурної цілісності та функцій інтерферону, вказуючи на потенційний вплив нітазоксаніду на активність білка. Результати обох методів докінгу, хоч і не ідентичні, підкреслюють важливість використання різних

обчислювальних підходів для глибшого розуміння ліганд-білкових взаємодій.

Виявлено важливі взаємодії між спермідином та інтерфероном альфа-2b. Результати вказують на взаємодію ключовими залишками інтерферону, такими як GLU:141 та ASP:2. Різні типи взаємодій, такі як сили Ван-дер-Ваальса, водневі зв'язки, гідрофобні взаємодії і навіть несприятливі взаємодії метал-донор, сприяють стабільності та специфічності сайтів зв'язування. Особливо значущими є взаємодії з CYS:98 та GLU:141, які є критично важливими для структурної цілісності та функцій інтерферону альфа-2b. Це вказує на потенційний вплив спермідину на активність інтерферону, що має важливе значення для розуміння його біологічної ролі, особливо у контексті терапевтичного використання.

ВИСНОВКИ

Лізоцим має високу термічну та pH-стабільність і демонструє антивірусні та антимікробні ефекти, важливі для стимулювання імунної відповіді та зменшення окислювального стресу. Лактоферин є залізозв'язуючим глікопротеїном, що відіграє роль у контролі гомеостазу заліза, має противірусні властивості, особливо проти SARS-CoV-2, та проявляє імуномодулюючий ефект і антиоксидантну дію. Інтерферон α-2b, як глікопротеїн зі специфічною структурою, регулює експресію генів, сприяє боротьбі з інфекціями і впливає на клітинну диференціацію та імунну активність, зокрема в контексті SARS-CoV-2. Спермідин, аліфатичний поліамін, відзначається своїми протизапальними та антиоксидантними властивостями, впливаючи на метаболічні та мітохондріальні функції і має потенціал у лікуванні інфекцій, включаючи SARS-CoV-2. Нітазоксанід, розроблений як антипаразитний агент, виявив широкий спектр антибактеріальної та противірусної активності, включаючи ефективність проти SARS-CoV-2.

У результаті докінгу шести комбінацій ліганд-білок з використанням SwissDock та PatchDock було виявлено:

1. **Нітазоксанід і лізоцим**: Взаємодія через GLU:35, ASP:53, ALA:108, TRP:109, GLN:58, VAL:110, ASN:60. Типи взаємодій: ван-дер-ваальсові зв'язки, Pi-Anion, Pi-Alkyl, водневі зв’язки, Pi-Pi stacking, Pi-Sulfur. Вплив на активний центр лізоциму зумовлений сильною специфічністю нітазоксаніду до GLU:35.
2. **Спермідин і лізоцим**: Ключові залишки: ALA:108, TRP:109, ASN:60, LYS:1, ARG:115, ASN:114, TYR:124. Типи взаємодій: ван-дер-ваальсові, водневі, вуглець-водневі зв’язки, Pi-взаємодії. Вплив на активний центр через взаємодію з GLU:35 і ASP:53.
3. **Нітазоксанід і лактоферин**: Взаємодія з GLU:354, ASN:640, TYR:526, VAL:11, LEU:299, ARG:587. Типи взаємодій: ван-дер-ваальсові, водневі

зв'язки, Pi-аніонні та Pi-катіонні. Можливий вплив на функції зв'язування заліза та карбонат-іонів у лактоферині.

4. **Спермідин і лактоферин**: Основні взаємодії через ASP:60 і ARG:121. Типи взаємодій: ван-дер-ваальсові, водневі, вуглець-водневі зв’язки. Вплив на функції зв'язування заліза та карбонат-іонів.
5. **Нітазоксанід і інтерферон-альфа-2b**: Взаємодія з ASP:2, GLN:158. Типи взаємодій: ван-дер-ваальсові, водневі, гідрофобні. Вплив на структурну цілісність і функцію інтерферону.
6. **Спермідин і інтерферон-альфа-2b**: Взаємодія з GLU:141, ASP:2, CYS:98. Типи взаємодій: ван-дер-ваальсові, водневі зв'язки, гідрофобні. Вплив на активність інтерферону.

SwissDock та PatchDock виявилися ефективними для аналізу міжмолекулярних взаємодій. Відмінності в результатах підкреслюють важливість багатоаспектного аналізу. Discovery Studio та PLIP також доповнюють одне одного, надаючи глибший аналіз взаємодій ліганд-білок.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

[1] Zhou Q, Chen V, Shannon CP, Wei X-S, Xiang X, Wang X, Wang Z-H, Tebbutt SJ, Kollmann TR and Fish EN (2020) Interferon-α2b Treatment for COVID-19. Front. Immunol. 11:1061.

[2] Pereda, R., González, D., Rivero, H. B., Rivero, J. C., Pérez, A., Lopez, L. D. R., Nodarse, H. (2020). Therapeutic Effectiveness of Interferon Alpha 2b Treatment for COVID-19 Patient Recovery. Journal of Interferon & Cytokine Research, 40(12), 578–588.

[3] E. J. W. N. Hanstock HG, "Tear lactoferrin and lysozyme as clinically relevant biomarkers of mucosal immune competence," *Front. Immunol.,* vol. 10, no. 1178 , 2019.

[4] Kawashima, M., Kawakita, T., Inaba, T., Okada, N., Ito, M., Shimmura, S., … Tsubota, K. (2012). Dietary Lactoferrin Alleviates Age-Related Lacrimal Gland Dysfunction in Mice. PLoS ONE, 7(3), e33148.

[5] C. A. Ragland SA, "From bacterial killing to immune modulation: recent insights into the functions of lysozyme," *PLoS Pathog.,* no. 13(9), 2017.

[6] Vilas Boas, L. C. P., Campos, M. L., Berlanda, R. L. A., de Carvalho Neves, N., & Franco, O. L. (2019). Antiviral peptides as promising therapeutic drugs. Cellular and Molecular Life Sciences.

[7] Berlutti, F., Pantanella, F., Natalizi, T., Frioni, A., Paesano, R., Polimeni, A., & Valenti, P. (2011). Antiviral Properties of Lactoferrin—A Natural Immunity Molecule. Molecules, 16(8), 6992–7018.

[8] Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. Immunological Reviews, 202(1), 8–32.

[9] J. R. C. Schoggins, "Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions.," *Curr Opin Virol,* no. 1, p. 519–525, 2011.

[10] Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y., & Ahn, D. U. (2013). Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and

pharmaceutical agents--A review. Poultry Science, 92(12), 3292–3299.

[11] Young, A. C. M., Tilton, R. F., & Dewan, J. C. (1994). Thermal expansion of hen egg-white lysozyme. Journal of Molecular Biology, 235(1), 302–317.

[12] Ibrahim HR, " Insights into the structure–function relationships of ovalbumin, ovotransferrin, and lysozyme," *CRC Press,* p. 37–56, 1997.

[13] Tomizawa, H., Yamada, H., & Imoto, T. (1994). The Mechanism of Irreversible Inactivation of Lysozyme at pH 4 and 100 .degree.C. Biochemistry, 33(44), 13032–13037.

[14] J. J. Jolles P, "What's new in lysozyme research?," *Mol Cell Biochem,* no. 63, p. 65–189, 1984.

[15] Woods, C. M., Hooper, D. N., Ooi, E. H., Tan, L.-W., & Carney, A. S. (2011). Human Lysozyme has Fungicidal Activity against Nasal Fungi. American Journal of Rhinology & Allergy, 25(4), 236–240.

[16] M. C. Callewaert L, "Lysozymes in the animal kingdom," *Biosci.*, no. 35(1), pp. 127-187, 2010.

[17] Zhang, X., Jiang, A., Yu, H., Xiong, Y., Zhou, G., Qin, M., … Wang, J. (2016). Human Lysozyme Synergistically Enhances Bactericidal Dynamics and Lowers the Resistant Mutant Prevention Concentration for Metronidazole to Helicobacter pylori by Increasing Cell Permeability. Molecules, 21(11), 1435.

[18] L I Gordon, S D Douglas, N E Kay, O Yamada, E F Osserman, H S Jacob, "Modulation of neutrophil function by lysozyme. Potential negative feedback system of inflammation," *Clin. Invest.*, no. 64(1), p. 226–232, 1979.

[19] Tagashira, A., Nishi, K., Matsumoto, S., & Sugahara, T. (2018). Anti-inflammatory effect of lysozyme from hen egg white on mouse peritoneal macrophages. Cytotechnology, 70(3), 929–938.

[20] B. A. C. L. e. a. Helmfors L, "Protective properties of lysozyme on β-

amyloid pathology: implications for Alzheimer disease," *Neurobiol. Dis.*, no. 83, p. 122–133 , 2015.

[21] Ashlee D. Brunaugh,Hyojong Seo,Zachary Warnken,Li Ding,Sang Heui Seo,Hugh D. C. Smyth, "Development and evaluation of inhalable composite niclosamide-lysozyme particles: A broad-spectrum, patient-adaptable treatment for coronavirus infections and sequalae," *Plos One*, no. DOI: 10.1371/journal.pone.0246803, 2021.

[22] Z. M. Artym J, "Milk-derived proteins and peptides in clinical trials," *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*, no. 67, p. 800–816, 2013.

[23] M. J. De Douder C, "On lysozyme therapy. I. Lysozyme tablets in treatment of some localized and generalized viral skin diseases," *Medickon* , no. 3, p. 19–20, 1974.

[24] M Sato, H Oe, M Nakano, H Kawasaki, C Hirayama, "A random controlled study of the prophylactic effect of lysozyme chloride on post-transfusion hepatitis," *Hepatogastroenterology* , no. 28, p. 135–138, 1981.

[25] Sava G., Pharmacological aspects and therapeutic applications of lysozymes. In: Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology, Berlin: Birkhauser Verlag, 1996.

[26] Cheng, W. D., Wold, K. J., Bollinger, L. B., Ordiz, M. I., Shulman, R. J., Maleta, K. M., … Trehan, I. (2019). Supplementation With Lactoferrin and Lysozyme Ameliorates Environmental Enteric Dysfunction. The American Journal of Gastroenterology, 114(4), 671–678.

[27] B. T. Luniakin AA, "Lysozyme in the overall treatment of children with an influenza infection and pneumonia," *Pediatr. Akus. Ginekol.*, no. 1, p. 11–13, 1977.

[28] Griswold, K. E., Bement, J. L., Teneback, C. C., Scanlon, T. C., Wargo, M. J., & Leclair, L. W. (2014). Bioengineered lysozyme in combination therapies forPseudomonas aeruginosalung infections. Bioengineered, 5(2), 143–147.

[29] L. M. H. D. L. X. C. J. Bhavsar T, "Aerosolized recombinant human lysozyme ameliorates Pseudomonas aeruginosa-induced pneumonia in hamsters," *Exp. Lung Res.*, no. 36(2), p. 94–100, 2010.

[30] S. B. C. J. T. G. Cantor JO, "The effect of lysozyme on elastase-mediated injury," *Exp. Biol. Med. (Maywood)* , no. 227(2), p. 108–113, 2002.

[31] T. A. V. H. N. M. 1. Li YM, "Antibacterial activity of lysozyme and lactoferrin is inhibited by binding of advanced glycation-modified proteins to a conserved motif," *Nat Med.* , no. 1(10), pp. 1057-1118, 1995.

[32] G. V. L. H. L. L. O. A. G. T. e. a. Ganz T, " Increased inflammation in lysozyme M-deficient mice in response to Micrococcus luteus and its peptidoglycan," *Blood,* no. 101(6), pp. 2388-2480, 2003.

[33] V. O. T. Kraskevich, "Lysozyme - the frontiers of possibility," *Modern Problems of Science and Education,* 2020.

[34] D. Legrand, "Overview of lactoferrin as a natural immune modulator," *Journal of Pediatrics,* no. 173, pp. 10-15, 2016.

[35] L. R. A. &. E. R. V. Anghel, "Structural aspects of human lactoferrin in the iron-binding process studied by molecular dynamics and small-angle neutron scattering," *The European Physical Journal E,* no. 41(9), 2018.

[36] L. A. H. P. a. T. J. M. Lambert, "Evolution of duplications in the transferrin family of proteins," *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology,* no. 140(1), pp. 11-25, 2005.

[37] B. Y. P. T. E. B. a. B. A. Wang, "Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, no. 59(4), pp. 580-596, 2019.

[38] B. H. N. G. R. S. B. E. Anderson BF, "Apolactoferrin structure demonstrates ligand-induced conformational change in transferrins," *Nature,* no. 344, pp. 784-787, 1990.

[39] K. T. M. &. M. B. Mizutani, "X-ray structures of transferrins and related

proteins," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA),* no. 1820(3), p. 203–211, 2012.

[40] A. B. G. C. H. M. B. E. Moore SA, "Threedimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8A resolution," *Mol. Biol.,* no. 274, p. 222–236, 1997.

[41] G. J. R. C. L. P. A. B. D. Karav S, "Studying lactoferrin N-glycosylation," *Mol. Sci. ,* no. 18, p. 870, 2017.

[42] M. P. H. J. Querinjean P, "Molecular weight, single-chain structure and amino acid composition of human lactoferrin," *Eur J Biochem. ,* no. 20, p. 420–425, 1971.

[43] A. B. N. G. T. D. B. E. Jameson GB, "Structure of human apolactoferrin at 2.0A resolution. Refinement and analysis of ligand-induced conformational change," *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr,* no. 54, p. 1319–1335, 1998).

[44] D. E. E. M. C. a. J. M. Legrand, "Lactoferrin: A modulator of immune and inflammatory responses," *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS,* no. 62(22), p. 2549–2559, 2005.

[45] M. a. J. A. Zimecki, "Therapeutic properties of proteins and peptides from colostrum and milk," *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej,* no. 59, p. 309–323, 2005.

[46] "Lactoferrin - A glycoprotein of great therapeutic potentials," *Developmental Period Medicine,* no. 20(2), pp. 118-125, 2016.

[47] T. Ganz, "Iron and infection," *International Journal of Hematology,* no. 107(1), p. 7–15, 2017.

[48] P. F. N. T. e. a. Berlutti F, "Antiviral properties of lactoferrin: a natural immunity molecule," *Molecules* , no. 16, p. 6992–7018, 2011.

[49] P. P. S. U.-L. a. O. M. C. Ward, "Lactoferrin and host defense," *Biochemistry and Cell Biology¼Biochimie et Biologie Cellulaire,* no. 80(1), p. 95–102, 2002.

[50] A. L. R. G. I. M. S. L. M. C. B. D. P. P. V. a. G. M. Cutone, "Lactoferrin’s anti-cancer properties: Safety, selectivity, and wide range of action," *Biomolecules,* no. 10(3), p. 456, 2020.

[51] N. D. J. E. B. W. M. C. J. S. a. S. P. C. Embleton, "Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential," *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine,* no. 18(3), p. 143–149, 2013.

[52] D. A. A. B. H. L. I. M. C. A. B. J. P. N. a. S. R. P. Kaufman, "Dose escalation study of bovine lactoferrin in preterm infants: Getting the dose right," *Biochemistry and Cell Biology,* no. 99(1), pp. 7-13, 2021.

[53] L. V. K. S. L. B. Jiang R, "Apo- and holo-lactoferrin are both internalized by lactoferrin receptor via clathrin-mediated endocytosis but differentially affect ERK-signaling and cell proliferation in Caco-2 cells," *Cell Physiol.*, no. 226, pp. 3022-3031, 2011.

[54] L. V. L. B. Suzuki YA, "Mammalian lactoferrin receptors: structure and function," *Cell Mol Life Sci.,* no. 62, p. 2560–2575, 2005.

[55] L. H.-G. K. M. K. H.-M. J. J.-Y. K. W.-J. Seong K-J, "Epigallocatechin-3-gallate rescues LPS-impaired adult hippocampal neurogenesis through suppressing the TLR4-NF-kB signaling pathway in mice," *Korean J Physiol Pharmacol,* no. 20, p. 41–51, 2016.

[56] F. S. M. A. Futosi K, "Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways," *Int Immunopharmacol.*, no. 17, p. 638–650, 2013.

[57] I. Y. S. K. T. T. A. Y. K. H. Harada E, "Characteristic transport of lactoferrin from the intestinal lumen into the bile via the blood in piglets," *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. ,* no. 124, p. 321–327, 1999.

[58] F. P. M. M. S. L. E. R. T. M. Roseanu A, "Liposomalization of lactoferrin enhanced its antitumoral effects on melanoma cells," *Biometals,* no. 23, p. 485–492, 2010.

[59] T. T. S. A. K. H. S. H. e. a. KamemoriN, "Trans-endothelial and trans-epithelial transfer of lactoferrin into the brain through BBB and BCSFB in adult rats," *J Vet Med Sci.*, no. 70, p. 313–315, 2008.

[60] T. M. T. Y. S. S. T. M. Saito H, "Physicochemical and antibacterial properties of lactoferrin and its hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH," *Adv. Exp. Med. Biol.* , no. 357, p. 219–226, 1994.

[61] S. a. M. M. A. Sabra, "Lactoferrin, a unique molecule with diverse therapeutical and nanotechnological applications," *International Journal of Biological Macromolecules,* no. 164, p. 1046–1060, 2020.

[62] I. A. T. S. C. S. A.-G. a. Q. R.-C. Garcıa-Montoya, "Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview," *Biochimica et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects* , no. 1820(3), p. 226–236, 2012.

[63] H. A. K. a. S. H. G. Shau, "Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin," *Journal of Leukocyte Biology,* no. 51(4), p. 343–349, 1992.

[64] R. H. D. M. D. P. B. a. D. T. Fischer, "Regulation of physiological and pathological Th1 and Th2 responses by lactoferrin," *Biochemistry and Cell Biology*, no. 84, p. 303–311, 2006.

[65] T. S. A.-G. B. F. I.-F. I. A. G.-M. J. S.-M. a. Q. R.-C. Siqueiros-Cendon, "Immunomodulatory effects of lactoferrin," *Acta Pharmacologica Sinica* , no. 35(5), p. 557–566, 2014.

[66] K. M. K. Y. U. H. N. J. M. H. T. M. D. H. K. S. H. K. M. T. e. a. Okubo, "Lactoferrin suppresses neutrophil extracellular traps release in inflammation," *EBioMedicine,* no. 10, p. 204–215, 2016.

[67] R. L. P. R. V. P. C. A. Lepanto MS, "Lactoferrin in aseptic and septic inflammation," *Molecules* , no. 24(7), p. 1323, 2019.

[68] K. E. K. A. H. N. G. R. Panahipour L, "Milk modulates macrophage polarization in vitro," *Cytokine,* no. 1(2), p. 100009 , 2019.

[69] F. Superti, "Lactoferrin from bovine milk: A protective companion for life," *Nutrients* , no. 12, p. 1–26, 2020.

[70] Y. T. H. L. C. C. C. Y. P. Y. L. H. C. T. M. F. L. a. C. M. C. Tung, "Bovine lactoferrin inhibits lung cancer growth through suppression of both inflammation and expression of vascular endothelial growth factor," *Journal of Dairy Science,* no. 96(4), p. 2095–2106, 2013.

[71] E. I. E. Y. J. M. I. D. G. S. a. Y. B.-M. Damiens, "Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells," *Journal of Cellular Biochemistry,* no. 74(3), p. 486–498, 1999.

[72] J. Y. N. D. J. L. K. Y. P. Z. G. &. J. C. Lang, "Inhibition of SARS Pseudovirus Cell Entry by Lactoferrin Binding to Heparan Sulfate Proteoglycans," *PLoS ONE,* no. 6(8), p. e23710, 2011.

[73] E. M. U. V. N. E.-F. E. M. &. A.-M. H. Redwan, "Potential lactoferrin activity against pathogenic viruses," *Comptes Rendus Biologies,* no. 337(10), p. 581–595, 2014.

[74] M. Belting, "Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier," *Trends in Biochemical Sciences,* no. 28(3), p. 145–151, 2003.

[75] S. L. W. C. &. E. J. D. Sarrazin, "Heparan Sulfate Proteoglycans," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology,* no. 3(7), p. a004952–a004952, 2011.

[76] B. S. L. G. B. M. Picard-Jean F, "The intracellular inhibition of HCV replication represents a novel mechanism of action by the innate immune lactoferrin protein," *Antiviral Res.,* no. 111, p. 13–22, 2014.

[77] K. D. Pretorius E, "Diagnostic morphology: biophysical indicators for iron-driven inflammatory diseases," *Integr. Biol. (Camb.),* no. 6(5), p. 486–510, 2014.

[78] T. A. Khiroya H, "The role of iron in pulmonary pathology," *Multidiscip. Respir. Med.*, no. 10, p. 34 , 2015.

[79] M. M. P. P. e. a. Connelly KG, "Serum ferritin as a predictor of the acute respiratory distress syndrome," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.,* no. 155(1), p. 21–25, 1997.

[80] J. Y. N. D. J. L. K. Y. P. Z. G. &. J. C. Lang, "Inhibition of SARS Pseudovirus Cell Entry by Lactoferrin Binding to Heparan Sulfate Proteoglycans," *PLoS ONE,* no. 6(8), p. e23710, 2011.

[81] Y. M. X. Z. F. X. Y. &. W. J. Hu, "The in vitro antiviral activity of lactoferrin against common human coronaviruses and SARS-CoV-2 is mediated by targeting the heparan sulfate co-receptor," *Emerging Microbes & Infections,* no. 10(1), pp. 317-330, 2021.

[82] G. I. K. A. A. E. D. G. H. a. J. M. S. Serrano, "Liposomal lactoferrin as potential preventative and cure for COVID-19," *International Journal of Health Sciences and Research,* no. 8(1), p. 8–15, 2020.

[83] Z. Y. W. L. e. a. WangQ, "Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2," *Cell* , no. 181(4), p. 894–904, 2020.

[84] W. J. Z. C. e. a. Mirabelli C, "Morphological cell profiling of SARS-CoV-2 infection identifies drug repurposing candidates for COVID-19," *bioRxiv* , no. 118(36), p. e2105815118, 2020.

[85] C. L. T. C. L. R. a. a. Elena Campione, "Lactoferrin Against SARS-CoV-2: In Vitro and In Silico Evidences," *Frontiers in Pharmacology,* no. 12, 2021.

[86] L. M. R. L. e. a. Cutone A, "Aerosolized bovine lactoferrin counteracts infection, inflammation and iron dysbalance in a cystic fibrosis mouse model of Pseudomonas aeruginosa chronic lung infection," *Int. J. Mol. Sci.,* no. 20(9), p. E2128 , 2019.

[87] H. S. K. M. Actor JK, "Lactoferrin as a natural immune modulator," *Curr. Pharm. Des.,* no. 15(17), p. 1956–1973, 2009.

[88] C. P. O. C. M. C. S. L. B. Mulder AM, "lactoferrin supplementation supports immune and antioxidant status in healthy human males," *Nutr.*

Res., no. 28(9), p. 583–589, 2008.

[89] Z. M. A. J. Kruzel ML, "Lactoferrin in a context of inflammation-induced pathology," *Front. Immunol.*, no. 8, p. 1438 , 2017.

[90] S. J. M.-M. D. L.-D. J. R. I. M. P. Fernandez-Musoles R, "Antihypertensive effects of lactoferrin hydrolyzates: inhibition of angiotensin- and endothelin-converting enzymes," *Food Chem*, no. 139(1–4), p. 994–1000, 2013.

[91] G. H. Rutherfurd KJ, "Peptides affecting coagulation," *Br. J. Nutr.*, no. 84(Suppl. 1), p. S99–S102, 2000.

[92] L. H. L. G. S. Y. F. M. N. Y. Han H, "Effect of bovine lactoferrin as a novel therapeutic agent in a rat model of sepsis-induced acute lung injury," *AMB Expr.*, no. 9, p. 177 , 2019.

[93] K. M. A. J. Hwang SA, "Oral recombinant human or mouse lactoferrin reduces Mycobacterium tuberculosis TDM induced granulomatous lung pathology," *Biochem. Cell Biol.*, no. 95(1), p. 148–154, 2017.

[94] O. H. Y. K. A. F. Wakabayashi H, "Lactoferrin for prevention of common viral infections," *J. Infect. Chemother.* , no. 20(11), p. 666–671, 2014.

[95] M. S. Carl Nathan, "Cytokines in Context," *The Journal of Cell Biology*, no. 113(5), pp. 981-986, 1991.

[96] J. L. A. Isaacs, "Virus interference. I. The interferon," *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, no. 147 , p. 258–267, 1957.

[97] I. K. B. W. R. S. R. S. G.R. Stark, "How cells respond to interferons," *Annu. Rev. biotherapeutic protein. Biochem.*, no. 67 , p. 227–264, 1998.

[98] C. D. R. H. B. W. E. B. R. B. M. W. T. N. P. T. S. P. L.M. Pfeffer, "Biological properties of recombinant a-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons," *Cancer Res.*, no. 58 , p. 2489–2499, 1998.

[99] S. Y. G. G. W. S. L. X. L. W. S. J. D. B. J. B. R. B. Grace, "Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon-a-2b," *J.*

Interferon Cytokine Res., no. 21, p. 1103–1115, 2001.

[100] J. F. R. R.-P. C. R. R. S. S. G. M. S. S. J. P. Glue, "Pegylated interferon-a2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data," *Clin. Pharmacol. Ther.,* no. 68 , p. 556–567, 2000.

[101] J. H. A. Kozlowski, "Improvements in protein PEGylation: pegylated interferons for treatment of hepatitis C," *J. Controlled Release,* no. 72, p. 217–224, 2001.

[102] G. Antonelli and C. Scagnolari, "Antiviral activity of the interferon α family: Biological and pharmacological aspects of the treatment of chronic hepatitis C," *Expert Opin. Biol. Ther.,* no. 13(5), pp. 693-711, 2013.

[103] F. E. Wang BX, "Global virus outbreaks: interferons as 1st responders," *Semin Immunol.,* no. 43:101300, 2019.

[104] G. &. R. R. Sen, "Interferon-induced antiviral actions and their regulation," *Adv. Virus Res.,* no. 42, pp. 57-102, 1993.

[105] S. &. D. F. Baron, "The interferons: a biological system with therapeutic potential in viral infections," *Antiviral Research,* no. 24(2-3), p. 97–110, 1994.

[106] R. Asmana Ningrum, "Human Interferon Alpha-2b: A Therapeutic Protein for Cancer Treatment. Scientifica," *Hindawi Publishing Corporation,* p. 1–8, 2014.

[107] R. Hu, K. Lei, J. Bekisz and K. Zoon, "Protein engineering of interferon alphas," *Methods Mol. Med.,* no. 116, pp. 69-80, 2005.

[108] N. K. H. T. a. J. H. T. A. Nyman, "Structural characterisation of N-linked and O-linked oligosaccharides derived from interferon-α2b and interferon-α14c produced by Sendai-virus- induced human peripheral blood leukocytes," *European Journal of Biochemistry,* no. 253(2), p. 485–493, 1998.

[109] J. R. C. Schoggins, "Interferon-stimulated genes and their antiviral effector

functions," *Curr Opin Virol*, no. 1, p. 519–525, 2011.

[110] K. T. A. T. T. Honda, "Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors," *Immunity* , no. 25, p. 349–360, 2006.

[111] M. J. G. W. B. Diana L. Brassard, "Interferon-α as an immunotherapeutic protein," *Journal of Leukocyte Biology,* no. 71(4), pp. 565-581, 2002.

[112] B. L. S. K. S. B. L. H. e. a. LoutfyM, "Interferon alfacon-1plus corticosteroids in severe acute respiratory syndrom," *JAMA,* no. 290, p. 3222–3228, 2003.

[113] J. U. B. G. R. A. R. Y. H.-Y. B. A. U. C. F. H. G. N. H. E. M. R. S. L. H. M. K. M. &. P. S. Gutterman, "Leukocyte interferon-induced tumor regression in human metastatic breast cancer, multiple myeloma, and malignant lymphoma," *Ann. Intern. Med.,* no. 93, pp. 399-406, 1980.

[114] C. E. Samuel, "Antiviral actions of interferons," *Clinical Microbiology Reviews*, no. 14(4), p. 778–809, 2001.

[115] D. J. L. Y.-F. L. e. a. M. C. Sarkar, "Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis," *Apoptosis*, no. 8(3), p. 237–249, 2003.

[116] F. E. T. P. F. &. K. G. Madeo, "Spermidine in health and disease," *Science*, no. 359(6374), p. eaan2788, 2018.

[117] A. E. Pegg, "Functions of Polyamines in Mammals," *Journal of Biological Chemistry*, no. 291(29), p. 14904–14912, 2016.

[118] K. &. K. K. Igarashi, "Modulation of cellular function by polyamines," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,* no. 42(1), p. 39–51, 2010.

[119] G. P. R. M. A. &. M. C. F. Guerra, "Modulation of learning and memory by natural polyamines," *Pharmacological Research,* no. 112, p. 99–118, 2016.

[120] T. K. H. S. A. B. S. R. C. C.-G. D. …. M. F. Eisenberg, "Induction of

autophagy by spermidine promotes longevity," *Nature Cell Biology,* no. 11(11), p. 1305–1314, 2009.

[121] K. S. R. K. K. &. I. K. Nishimura, "Decrease in Polyamines with Aging and Their Ingestion from Food and Drink," *The Journal of Biochemistry,* no. 139(1), p. 81–90, 2006.

[122] A. B. &. B.-W. E. Knott, "Impact of nitric oxide on metabolism in health and age-related disease," *Diabetes, Obesity and Metabolism,* no. 12, p. 126–133, 2010.

[123] V. Milovic, "Polyamines in the gut lumen: bioavailability and biodistribution," *European Journal of Gastroenterology & Hepatology,* no. 13(9), p. 1021–1025, 2001.

[124] T. A. M. S. S. P. U. S. S. P. T. …. S. A. Eisenberg, "Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine," *Nature Medicine,* no. 22(12), p. 1428–1438, 2016.

[125] Z. A. R. S. M. R.-N. L. K.-C. J. G. M. …. A. G. Zwighaft, "Circadian Clock Control by Polyamine Levels through a Mechanism that Declines with Age," *Cell Metabolism,* no. 22(5), p. 874–885, 2015.

[126] S. L. W. P. M. &. C. R. A. Nowotarski, "Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention," *Expert Reviews in Molecular Medicine,* no. 15, 2013.

[127] F. P. J. V. E. R. S. E. D. P. B. E. E. …. K. G. Pietrocola, "Caloric Restriction Mimetics Enhance Anticancer Immunosurveillance," *Cancer Cell,* no. 30(1), p. 147–160, 2016.

[128] C. B. M. A. P. L. S. M. &. K. G. López-Otín, "The Hallmarks of Aging," *Cell,* no. 153(6), p. 1194–1217, 2013.

[129] T. S. L. Y. J. W. H. G. A. C. J. …. P. G. Chen, "Rapamycin and other longevity-promoting compounds enhance the generation of mouse induced pluripotent stem cells," *Aging Cell,* no. 10(5), p. 908–911, 2011.

[130] Y. T. S. B. T. A. B. M. H. S. K. P. M. P. …. P. R. Ramot, "Spermidine Promotes Human Hair Growth and Is a Novel Modulator of Human Epithelial Stem Cell Functions," *PLoS ONE,* no. 6(7), p. e22564, 2011.

[131] L. M.-V. M. P. E. O. L. R.-U. J. R. E. …. M.-C. P. García-Prat, "Autophagy maintains stemness by preventing senescence," *Nature,* no. 529(7584), p. 37–42, 2016.

[132] R. A. R. T. M. F. M. &. R. D. C. Frake, "Autophagy and neurodegeneration," *Journal of Clinical Investigation,* no. 125(1), p. 65–74, 2015.

[133] Y. A. S. M. S. R. Y. T. A. L. Y. H. …. K. G. Ma, "Anticancer Chemotherapy-Induced Intratumoral Recruitment and Differentiation of Antigen-Presenting Cells," *Immunity,* no. 729–741, p. 38(4), 2013.

[134] K. T. A. P. S. V. O. G. S. K. S. A. B. M. F. …. A. R. Araki, "mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation," *Nature,* no. 460(7251), p. 108–112, 2009.

[135] E. L. W. M. C. C. P. J. H. G. M. S. H. W. L.-S. …. C. Y. Pearce, "Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism," *Nature,* no. 460(7251), p. 103–107, 2009.

[136] K. A.-A. J. W. A. S. P. L. A. S. H. E. M. …. S. A. K. Phadwal, "A novel method for autophagy detection in primary cells," *Autophagy,* no. 8(4), p. 677–689, 2012.

[137] E. S.-L. M. K. Z. Zhong, "Autophagy, NLRP3 inflammasome and auto-inflammatory/immune diseases," *Clin. Exp. Rheumatol.,* no. 34(98), p. 12–16, 2016.

[138] S. Z. e. al., "Spermine protects mice against lethal sepsis partly by attenuating surrogate inflammatory markers," *Mol. Med.,* no. 15, p. 275–282, 2009.

[139] M. H. &. I. K. Park, "Polyamines and Their Metabolites as Diagnostic

Markers of Human Diseases," *Biomolecules and Therapeutics,* no. 21(1), p. 1–9, 2013.

[140] B. E. D. A. M. X. Z. B. A. C. B. R. E. W. L. J. …. H. B. G. Sansbury, "Metabolomic Analysis of Pressure-Overloaded and Infarcted Mouse Hearts," *Circulation: Heart Failure,* no. 7(4), p. 634–642, 2014.

[141] X. N. M. B. E. C. T. M. B. P. A. P. K. P. G. …. G. B. D. Pan, "Alzheimer's disease–like pathology has transient effects on the brain and blood metabolome," *Neurobiology of Aging,* no. 38, p. 151–163, 2016.

[142] S. F. C. O. P. E. C. T. H. C. J. J. M. B. …. G. B. D. Graham, "Untargeted Metabolomic Analysis of Human Plasma Indicates Differentially Affected Polyamine and L-Arginine Metabolism in Mild Cognitive Impairment Subjects Converting to Alzheimer's Disease," *PLOS ONE,* no. 10(3), p. e0119452, 2015.

[143] N. C. P. J. B. T. E. J. D. F. C. R. L. …. M. M. A. Gassen, "SARS-CoV-2-mediated dysregulation of metabolism and autophagy uncovers host-targeting antivirals," *Nature Communications,* no. 12(1), 2021.

[144] Rossignol and Cavier, "Synthesis and antiparasitic activity of 2-benzamido nitrothiazoles," *Chem. Abstr.,* no. 83(1975), p. 28216n, 1975.

[145] J. R. R. Cavier, "Etude de diverses associations d'anthelminthiques chez la souris," *Rev. Méd. Vét.,* no. 133(1982), pp. 779-783, 1982.

[146] H. M. J.F. Rossignol, "Nitazoxanide in the treatment of Taenia saginata and Hymenolepis nana," *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* no. 33(1984), pp. 511-512, 1984.

[147] G. G. C. D. A. F. J. R. J. B. L. F. A. Baishanbo, "Efficacy of nitazoxanide and paromomycin on biliary tract cryptosporidiosis in an immunosuppressed gerbil model," *J. Antimicrob. Chemother.,* no. 57(2006), pp. 353-355, 2006.

[148] Ortiz, J. J., Ayoub, A., Gargala, G., Chegne, N. L., & Favennec, L. (2001).

Randomized clinical study of nitazoxanide compared to metronidazole in the treatment of symptomatic giardiasis in children from Northern Peru. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 15(9), 1409–1415.

[149] Freeman, J., Baines, S. D., Todhunter, S. L., Huscroft, G. S., & Wilcox, M. H. (2011). Nitazoxanide is active against Clostridium difficile strains with reduced susceptibility to metronidazole. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66(6), 1407–1408.

[150] Musher, D. M., Logan, N., Bressler, A. M., Johnson, D. P., & Rossignol, J. (2009). Nitazoxanide versus Vancomycin inClostridium difficileInfection: A Randomized, Double-Blind Study. Clinical Infectious Diseases, 48(4), e41–e46.

[151] De Carvalho, L. P. S., Darby, C. M., Rhee, K. Y., & Nathan, C. (2011). Nitazoxanide Disrupts Membrane Potential and Intrabacterial pH Homeostasis of Mycobacterium tuberculosis. ACS Medicinal Chemistry Letters, 2(11), 849–854.

[152] Duszynski, D. W., Kvičerová, J., & Seville, R. S. (2018). Treatment and Drug Therapies of Coccidiosis in Carnivora. The Biology and Identification of the Coccidia (Apicomplexa) of Carnivores of the World, 445–463.

[153] Rossignol, J.-F. (2014). Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent. Antiviral Research, 110, 94–103.

[154] Tilmanis, D., van Baalen, C., Oh, D. Y., Rossignol, J.-F., & Hurt, A. C. (2017). The susceptibility of circulating human influenza viruses to tizoxanide, the active metabolite of nitazoxanide. Antiviral Research, 147, 142–148.

[155] Mahmoud, D. B., Shitu, Z., & Mostafa, A. (2020). Drug repurposing of nitazoxanide: can it be an effective therapy for COVID-19? Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 18(1).

[156] Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., … Xiao, G. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged

novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. Cell Research, 30(3), 269–271.

[157] Kelleni, M. T. (2021). NSAIDs/nitazoxanide/azithromycin repurposed for COVID-19: potential mitigation of the cytokine storm interleukin-6 amplifier via immunomodulatory effects. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 1–5.

[158] Pepperrell, T., Pilkington, V., Owen, A., Wang, J., & Hill, A. M. (2020). Review of safety and minimum pricing of nitazoxanide for potential treatment of COVID-19. Journal of Virus Eradication, 6(2), 52–60.