

Пояснювальна записка

до дипломного проєкту (роботи)

БАКАЛАВРА

освітньо-кваліфікаційний рівень)

на тему:

на тему (укр. мова) Молекулярно-динамічне моделювання комплексів
протівірусних препаратів та ціанінових барвників з білками

на тему (англ. мова) Molecular dynamics modeling of antiviral drug complexes
and cyanine dyes with proteins

Виконав(ла): студент 4 курсу навчання
за ОПП бакалавр
спеціальності 105 Прикладна фізика та наноматеріали
освітня програма: Біомедичні нанотехнології

(назва)

ДЕОРДІЄВ Дмитро Русланович



(прізвище, ім'я, по батькові)

(особистий підпис)

Керівник доктор філософії

(вчений ступінь, вчене звання)

ТАРАБАРА У. К.



(прізвище та ініціали)

(особистий підпис)

Рецензент кандидат хімічних наук

(вчений ступінь, вчене звання)

ФАРАФОНОВ В. С.



(прізвище та ініціали)

(особистий підпис)

АНОТАЦІЯ

Деордієв Д. Р. – Молекулярно-динамічне моделювання комплексів противірусних препаратів та ціанінових барвників з білками. – Рукопис.

Дипломна робота бакалавра за спеціальністю 105 «Прикладна фізика та наноматеріали» – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, 2024.

56 с., 40 рис., 2 табл., 36 джерел.

Пандемія COVID-19 підкреслює нагальну потребу у пошуку нових стратегій боротьби з вірусними захворюваннями. З огляду на швидку мутацію вірусу SARS-CoV-2 самих лише вакцин може бути недостатньо.

Мета цієї роботи – дослідити, як противірусні препарати взаємодіють у комплексі з білками та ціаніновими барвниками.

Використовуючи молекулярне динамічне моделювання, в роботі аналізуються взаємодії компонентів в комплексах для розуміння їхньої ефективності.

В роботі досліджується загальна стабільність систем білок-ліганди, еволюція комплексів, конформаційні зміни білка.

Ці знання можуть допомогти покращити дизайн препаратів, роблячи їх більш ефективними, та зменшити ймовірність викликати побічні ефекти. Моделювання дає уявлення про те, як добре працюють ці препарати у взаємодії з різними молекулами та розширює знання про можливість використання білків як методів таргетної доставки ліків.

Ця робота підтримує зусилля з підготовки до майбутніх пандемій, пропонуючи нові стратегії лікування. Поєднання комп'ютерного моделювання з лабораторними тестами може призвести до розробки нових потужних противірусних препаратів та методів їх доставки, допомагаючи контролювати як нинішні, так і майбутні вірусні загрози.

ABSTRACT

Deordiiev, D. R. – Molecular Dynamics Modeling of Antiviral Drug Complexes and Cyanine Dyes with Proteins. – Manuscript.

Bachelor's thesis in speciality 105 "Applied Physics and Nanomaterials" – V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2024.

56 p., 40 figures, 2 tables, 36 sources.

The COVID-19 pandemic underscores the urgent need for new strategies to combat viral diseases. Given the rapid mutation of the SARS-CoV-2 virus, vaccines alone may be insufficient.

The aim of this work is to investigate how antiviral drugs interact in complex with proteins and cyanine dyes.

Using molecular dynamics modeling, the study analyzes the interactions of components in complexes to understand their effectiveness.

The work explores the overall stability of protein-ligand systems, complex evolution, and protein conformational changes. This knowledge can help improve drug design, making them more effective and reducing the likelihood of side effects. Modeling provides insight into how well these drugs work in interaction with different molecules and expands understanding of the potential use of proteins as drug delivery methods.

This work supports efforts to prepare for future pandemics by proposing new treatment strategies. Combining computer modeling with laboratory tests could lead to the development of new powerful antiviral drugs and delivery methods, helping to control both current and future viral threats.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1 Лізоцим: структура та біологічні функції	8
1.2 Інсулін: структура та біологічні функції	10
1.2.1 Структура інсуліну	11
1.2.2 Функція інсуліну.....	12
1.3 Механізми протівірусної дії лікарських препаратів.....	13
1.3.1 Молнупіравір	14
1.3.2 Фавіпіравір	16
1.3.3 Нірматрелвір і ритонавір.....	17
1.4 Метод молекулярної динаміки для дослідження міжмолекулярних взаємодій.....	19
1.5 Ціанінові (поліметинові) барвники	21
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	23
2.1 Отримання просторової структури молекул.....	23
2.2 Підготовка системи до моделювання	26
2.3 Моделювання молекулярної динаміки.....	29
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	32
ВИСНОВКИ	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	52

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

SARS-Cov-2 – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (Важкий гострий респіраторний синдром коронавірус 2)

RdRp – РНК-залежна РНК-полімераза

МД – молекулярна динаміка

RMSD – середньоквадратичне відхилення

RMSF – середньоквадратичні флуктуації

Rg – радіус інерції перерізу

ВСТУП

Враховуючи динамічний характер пандемії COVID–19, яка відзначається частою появою нових варіантів вірусу, важливість досліджень нових методів боротьби з хворобою неможливо переоцінити. Міністерство охорони здоров'я України в березні 2024 року повідомило про циркуляцію на її території 29 субваріантів штаму «Омікрон» [1], що свідчить про неабияку здатність вірусу до мутацій та адаптації. Ця різноманітність в межах одного штаму підкреслює складність вірусу та виклик, який він ставить перед системою охорони здоров'я, що змушує ще більш ретельно підходити до питань стратегії вакцинації та лікування.

Вакцинація продовжує бути ключовим компонентом у лікуванні COVID–19, знижуючи ризик серйозних випадків захворювання та потреби в госпіталізації. Однак ефективність вакцин дещо послаблюється швидкою еволюцією вірусу та селективністю вакцин щодо конкретних підтипів вірусу. Захист, який пропонують вакцини, може бути недовговічним завдяки швидкій появі нових штамів, що зумовлює потребу у застосуванні бустерних доз, і розробці оновлених вакцин, націлених на нові штами. Важливо розвивати додаткові методи лікування для вирішення проблем, пов'язаних з мутаціями вірусу [2].

Розробка та впровадження терапевтичних препаратів пропонує додатковий до вакцинації шлях лікування. Лікарські препарати можуть безпосередньо націлюватися на вірус, пригнічуючи вірусні ферменти, що беруть участь у реплікації геному, або запобігати проникненню вірусу в клітини організму. Таким чином, терапевтичні засоби можуть суттєво полегшити перебіг хвороби, збільшуючи шанси пацієнта на швидше одужання від хвороби та зменшуючи навантаження на систему охорони здоров'я, що є критично важливим під час глобальної пандемії.

Актуальність досліджень взаємодії функціональних білків організму з лікарськими препаратами полягає в низці причин. Ферменти приймають участь в багатьох фізіологічних процесах в організмі. Вони мають змогу

взаємодіяти з препаратами та впливати на їх ефективність, тож розуміння тонкощів такої взаємодії дозволить отримати більше даних про метаболізм препаратів, потенційно збільшити ефективність та дослідити їх безпечність для людини.

Загально відомо, що функція білка нерозривно пов'язана з його просторовою структурою. Під час взаємодії з іншими молекулами конформація білка змінюється. Якщо при зв'язуванні препарату з функціональним білком, зміниться функція останнього, це може призвести до небажаних наслідків, враховуючи їх неабияку важливість.

З огляду на це, метою даної роботи було охарактеризувати вплив трьох ціанінових барвників (AK7-5, AK5-6, AK3-11) і 4 противірусних препаратів (фавіпіравір, молнупіравір, нірматрелвір і ритонавір) на структуру та динаміку лізоциму та інсуліну в системах препарат-білок-барвник. Для досягнення цієї мети були виконані наступні завдання:

- 1) Побудувати та оптимізувати структури ціанінових барвників та лікарських препаратів в програмах MarvinSketch та Avogadro;
- 2) Підготувати системи препарат-білок-барвник для проведення подальших молекулярно-динамічних розрахунків на сервері Charmm-gui;
- 3) Провести 5 нс молекулярно-динамічну симуляцію для всіх систем в середовищі GROMACS;
- 4) Проаналізувати отримані результати та вибрати найбільш перспективні системи;
- 5) Провести 100 нс молекулярно-динамічну симуляцію кількох систем в середовищі GROMACS;
- 6) Зробити аналіз отриманих результатів з використанням функцій GROMACS та можливостей програми VMD.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Лізоцим: структура та біологічні функції

Лізоцим – це природний фермент, присутній в різних біологічних організмах, таких як бактерії, гриби та тварини. Лізоцим проявляє антибактеріальну дію та є частиною імунітету людини.

Він присутній практично у всіх рідинах організму, хоча і в різних кількостях. У сироватці крові його концентрація зазвичай становить від 7 до 13 мг/л. Найбільший вміст був виявлений в слюзах, приблизно в 120 разів вище, ніж в сироватці. Значна кількість лізоциму була виявлена в шлунковому соку, а в інших рідинах організму активність лізоциму виявилася такою ж, як і в сироватці крові [3]. Також лізоцим присутній у слизу та грудному молоці. Наявність лізоциму в цих рідинах допомагає запобігти колонізації і росту хвороботворних бактерій в організмі.

Не дивлячись на те, що лізоцим відомий людству відносно давно, у світлі сьогоdnішніх подій він знову звертає на себе увагу наукової спільноти. Виявлено, що лізоцим відповідальний за перешкоджання проникнення вірусу SARS–Cov–2 через слизові оболонки ока, а також протидіє розвитку надмірного запалення, яке є одним з симптомів коронавірусу [4][5].

Лізоцим належить до класу гідролаз, тобто ферментів, що каталізують гідроліз ковалентного зв'язку. Механізм його дії в першу чергу спрямований на пептидоглікановий шар бактеріальних клітинних стінок. Пептидоглікан – це складний полімер, який забезпечує структурну цілісність бактеріальних клітинних стінок, особливо у грампозитивних бактерій.

Лізоцим розпізнає і зв'язується зі специфічним субстратом всередині шару пептидоглікану. Після зв'язування лізоцим каталізує гідроліз β -1,4 глікозидного зв'язку між N-ацетилглюкозаміном та N-ацетилмурамовою кислотою у ланцюгу пептидоглікану. Цій реакції сприяють два ключових залишки в активному сайті лізоциму: глутамінова кислота (Glu35) і аспартат (Asp52). Глутамінова кислота діє як донор протонів до атома кисню, що

поєднує два залишки, тим самим послаблюючи глікозидний зв'язок. Аспарат дозволяє приєднати молекулу води і завершити реакцію гідролізу [6][7].

Ферментативне розщеплення глікозидних зв'язків призводить до деградації пептидогліканового шару. Деградація цього шару порушує клітинну стінку, що призводить до нездатності бактерії підтримувати свою форму і цілісність через різницю тисків, в результаті чого бактеріальна клітина гине [6].

Лізоцим особливо ефективний проти грамполозитивних бактерій завдяки їх товстому шару пептидоглікану, який доступний ферменту. Його ефективність проти грамнегативних бактерій менш виражена через зовнішню мембрану цих бактерій, що обмежує доступ до шару пептидоглікану.

На основі відмінностей в амінокислотній послідовності, біохімічних і ферментативних властивостях лізоцими класифікуються на декілька типів. У тварин було виділено три основних типи: с-тип (курячий або звичайний тип), g-тип (гусячий тип) та і-тип (безхребетний тип). Ці типи по-різному розповсюджені серед тварин, і певний організм може виробляти тільки один, два або три різних типи цього ферменту. Крім того, зазвичай кожен тип має два або більше паралогів – варіантів білка, що виникли в результаті хромосомної мутації при дуплікації кодуєчого гену [8].

Курячий (cLys) та людський (hLys) лізоцими належать до с-типу. cLys складається з 129 амінокислотних залишків (14,3 кДа), тоді як hLys складається з 130 амінокислотних залишків (14,7 кДа). Амінокислотна послідовність лізоциму курки та людини на 59% є ідентичною, проте антибактеріальна активність hLys втричі більша [9].

Багато методів, як фізичних так і хімічних, були запропоновані і успішно розвиваються, і спрямовані на підвищення ефективності лізоциму проти грамнегативних бактерій. Беручи до уваги антибактеріальну, противірусну, протигрибкову, протизапальну, протиракову та імуномодулюючу активність [9], лізоцим має великий потенціал, головним чином у клінічному застосуванні, для лікування збудників різного характеру.

Біосинтез і секреція інсуліну контролюються рівнем циркулюючої глюкози і підвищуються, коли рівень глюкози в крові високий. Біосинтез інсуліну стимулюється, коли концентрація глюкози становить від 2 мМ до 4 мМ, а секреція пригнічується, коли рівень глюкози піднімається вище 5 мМ, тобто за високого рівня цукру в крові, інсулін перестає виділятися у кровотік.

1.2.1 Структура інсуліну

Інсулін - це дволанцюговий гетеродимер. А-ланцюг складається з 21-го амінокислотного залишку, а В-ланцюг налічує 30 амінокислотних залишків. Ланцюги з'єднані двома дисульфідними зв'язками, отриманими із залишків цистеїну (A7-B7 і A20-B19).

Ланцюги інсуліну мають розгалужену вторинну структуру, незважаючи на їх обмежену довжину. Ланцюг А складається з двох майже антипаралельних α -спіральных сегментів (A1-A8 і A12-A19). Ці спіралі з'єднані неканонічним витком (A9-A12), зближуючи N- і C-кінці ланцюга.

В-ланцюг містить центральну α -спіраль (залишки B9-B19), до якої приєднані два дисульфідні містки (A7-B7 і A20-B19), і β -повороти (B7-B10 і B20-B23). Кожен β -поворот містить принаймні один гліцин (Gly) з позитивним двограним кутом (залишки B8, B20 і B23). β -поворот B7-B10 дозволяє бічному ланцюгу His^{B5} взаємодіяти з центральною областю ланцюга А. В свою чергу, β -поворот B20-B23 орієнтує С-термінальний сегмент В-ланцюга (залишки B23-B30) безпосередньо близькості та антипаралельно центральній α -спіралі В-ланцюга. Залишки B24-B28 мають структуру β -ланцюга. Ароматичні бічні ланцюги Phe^{B24} і Tyr^{B26} знаходяться в контакті з Leu^{B11}, Val^{B12} і Leu^{B15} центральної α -спіралі В-ланцюга.

З'єднання А- і В-ланцюга ховає всередину білка атоми сірки цистинів A6-A11 і A20-B19, а також неполярних бічних ланцюгів Ile^{A2}, Val^{A3}, Leu^{A16}, Tyr^{A19}, Leu^{B6}, Leu^{B11} і Leu^{B15}. Край гідрофобного ядра частково оголює Val^{A3}, Ile^{A13}, Val^{B12}, Val^{B18}, Phe^{B24} і Tyr^{B26}. Разом ці залишки сприяють стабільності нативної структури, а також вносять свій внесок у поверхню молекули, яка

частково піддається впливу розчинника в мономері та бере участь у димеризації або збірці гексамерів.

1.2.2 Функція інсуліну

Після вивільнення, інсулін циркулює в крові, досягаючи клітин печінки, м'язів і жирової тканини, де він приймає участь у метаболізмі глюкози, в результаті чого її рівень в крові знижується.

Інсулін контролює багато біологічних процесів в яких приймає участь INSR – рецептор інсуліну. Активованій INSR ініціює фосфорилування субстратів, пов'язаних із сигнальними шляхами інсуліну, активуючи ферменти, що беруть участь у контролі метаболічних процесів і росту. Порушення в цих сигнальних шляхах можуть спричинити резистентність до інсуліну.

Дія інсуліну починається, коли інсулін зв'язується зі своїм рецептором, локалізованим на клітинній мембрані клітин–мішеней.

Основним органом дії інсуліну є печінка. Після того, як гормон зв'язується з INSR відбувається низка різних процесів, які в результаті призводять до пригнічення експресії гену, що відповідає за глюконеогенез – метаболічний шлях утворення глюкози з вуглецевих субстратів. Більш того, інсулін збільшує синтез глікогену в печінці завдяки регуляції глікогенсинтетази та глікогенфосфорилази. Як відомо, основна функція глікогену – це запасання глюкози в організмі. Схожу функцію виконує інсулін і в клітинах скелетних м'язів. Зв'язуючись з рецептором INSR, запускається сигнальний шлях, який в результаті призводить до стимуляції синтезу глікогену клітиною.

В адипоцитах – жирових клітинах організму – інсулін пригнічує ліполіз, який, у свою чергу, спричиняє пригнічення вироблення печінкою глюкози.

Інсулін також бере участь у регуляції процесів в інших органах і клітинах. Він регулює експресію та активність різних білків, ферментів, факторів транскрипції, білків, які регулюють клітинний цикл і апоптоз.

Інсулін також регулює роботу підшлункової залози. Наприклад, він пригнічує секрецію глюкагону з α -клітин підшлункової залози, запобігаючи підвищенню рівня глюкози внаслідок процесу глікогенолізу. Інсулін зменшує секрецію глюкагону, що, у свою чергу, посилює багато метаболічних ефектів, пов'язаних з дією інсуліну. Він також стимулює δ -клітини панкреатичних острівців, які секретують соматостатин.

Секреція інсуліну з β -клітин є важливим кроком у регуляції гомеостазу глюкози у здорових людей. Секреція порушується як при цукровому діабеті (ЦД) першого, так і другого типу.

Цукровий діабет — це метаболічний розлад, що характеризується високим рівнем глюкози в крові протягом тривалого періоду часу. Цей стан тісно пов'язаний з функцією інсуліну.

Діабет 1 типу – це автоімунний стан, при якому імунна система помилково атакує бета-клітини підшлункової залози, що виробляють інсулін, що призводить до часткової або повної зупинки вироблення інсуліну. В результаті глюкоза залишається в крові, викликаючи гіперглікемію. Цукровий діабет 1 типу частіше діагностується у дітей і підлітків. Діабет 1 типу є насамперед результатом генетичних і навколишніх факторів, які призводять до аутоімунного руйнування бета-клітин підшлункової залози, причому фактор способу життя відіграє роль у лікуванні захворювання, але не є причиною виникнення хвороби.

Діабет 2 типу викликаний інсулінорезистентністю – станом, за якого клітини організму ефективно не реагують на інсулін, у поєднанні з можливим зниженням вироблення інсуліну через втому бета-клітин підшлункової залози.

1.3 Механізми противірусної дії лікарських препаратів

В останні роки сфера противірусної терапії динамічно розвивається через появу нових збудників, що зумовило необхідність дослідження нових та вдосконалення існуючих фармацевтичних противірусних засобів.

Цей розділ присвячений групі противірусних препаратів — молнупіравіру, фавіпіравіру, нірматрелвіру та ритонавіру — кожен із яких відіграє важливу роль у лікуванні вірусних інфекцій через різні механізми дії. Початково ці препарати розроблені для боротьби з різними вірусами, але у світлі останніх подій вони були перепрофільовані та адаптовані для задоволення нагальних потреб, викликаних глобальною кризою в галузі охорони здоров'я – пандемією COVID-19.

Молнупіравір і фавіпіравір є синтетичними похідними нуклеозидів, що спрямовані на взаємодію з вірусною RdRp (РНК-залежною РНК-полімеразою), вносячи помилки під час реплікації вірусу. В свою чергу, нірматрелвір, який використовується в поєднанні з ритонавіром у складі препарату, відомого як Paxlovid, пригнічує основну протеазу SARS-CoV-2, таким чином запобігаючи розмноженню вірусу. Ритонавір, який в першу чергу є препаратом проти ВІЛ, підвищує ефективність нірматрелвіру, пригнічуючи його метаболічну деградацію, що посилює фармакокінетичний профіль основного препарату.

1.3.1 Молнупіравір

Молнупіравір, також відомий як EIDD-2801, є проліком ізопропілового ефіру рибонуклеозидного аналога N4-гідроксицитидину, який планувалось застосовувати для боротьби з грипом в 2019 році [12].

Проліки – це фармакологічно неактивні сполуки, які метаболічно перетворюються в активний препарат в організмі за допомогою хімічних або ферментативних реакцій. Цей процес перетворення зазвичай відбувається після введення, що дозволяє пролікам проявляти свої терапевтичні ефекти.

N(4)-гідроксицитидин є нуклеозидним аналогом цитидину, який містить гідроксильну групу в N(4)-положенні. N4-гідроксицитидин, або EIDD-1931, індукує мутації у віріонах РНК. N4-гідроксицитидин вперше був описаний в літературі в 1980 році як потужний мутаген бактерій і фагів. Він продемонстрував противірусну активність проти вірусу венесуельського енцефаліту коней і коронавірусу людини HCoV-NL63 *in vitro*. Було показано,

що N4-гідроксицитодин інгібує SARS-CoV-2, а також інші коронавіруси людини та кажанів у мишей і епітеліальних клітин дихальних шляхів людини [13].

Молнупіравір відноситься до 5'-ізобутиратних проліків прямої дії противірусного рибонуклеозидного аналога, EIDD-1931 або β -D-N4-гідроксицитидину. У плазмі молнупіравір розщеплюється з вивільненням EIDD-1931. Внутрішньоклітинно EIDD-1931 фосфорилується кіназами організму до відповідного 5'-трифосфату, активного противірусного агента [14].

Препарат активується завдяки метаболізму. Потрапляючи всередину клітини, він стає РНК-подібним компонентом. На першому етапі РНК-полімераза (вірусна копіювальна машина) включає ці компоненти в геном РНК вірусу. На наступному етапі РНК-подібні компоненти поєднуються з компонентами вірусного генетичного матеріалу. В результаті вірусна РНК містить мутації, що перешкоджають розмноженню збудника.

Коли молнупіравір потрапляє в клітину, він перетворюється на свою активну форму, N-гідроксицитидингідрат (NHC-трифосфат або МТР). Ця активна форма має вирішальне значення для противірусної дії препарату.

Потрапляючи всередину клітини, активний молнупіравір може бути включений РНК-залежною РНК-полімеразою (RdRp) SARS-CoV-2 у синтезовані ланцюги РНК. RdRp – це фермент, відповідальний за реплікацію вірусної РНК. RdRp може замінювати природні будівельні блоки РНК, цитидинтрифосфат (СТР) або уридинтрифосфат (УТР), на МТР під час синтезу РНК.

Цей процес призводить до виробництва мутованого позитивного ланцюга геномної РНК. Мутації в позитивному ланцюзі спричинені наявністю МТР у шаблоні негативного ланцюга геномної РНК.

Продукти мутованої РНК перешкоджають створенню нових здорових вірусів. Накопичення мутацій, кількість яких перевищує певний критичний поріг, може зробити його нездатним до точної та ефективної реплікації.

Таке втручання запобігає утворенню повністю функціональних вірусів, зменшуючи поширення та тяжкість інфекції.

Зрештою, молнупіравір має відмінні фармакокінетичні властивості, включаючи показання до перорального застосування

1.3.2 Фавіпіравір

Розроблений в Японії, фавіпіравір є модифікованим аналогом піразину, який спочатку був схвалений для терапевтичного використання при резистентних випадках грипу.

Фавіпіравір не тільки пригнічує реплікацію грипу А і В, але цей препарат показав багатообіцяючі результати в лікуванні пташиного грипу та може бути альтернативою для штамів грипу, стійких до інгібіторів нейрамідаци. Фавіпіравір досліджували для лікування небезпечних для життя патогенів, таких як вірус Ебола, вірус Ласса, а тепер і COVID-19. [15]

Фавіпіравір є проліком, а його активна форма, фавіпіравір рибофуранозилтрифосфат (ФТР), пригнічує реплікацію вірусу шляхом націлювання на РНК-залежну РНК-полімеразу (RdRp). Існує дві провідні теорії впливу фавіпіравіру на вірусну полімеразу.

Перша полягає в тому, що активна форма фавіпіравіру утворюється внутрішньоклітинно та діє як аналог гуанозин- та аденозинтрифосфату (АТР/ГТР), згодом включаючись у РНК вірусу, що призводить до припинення синтезу РНК.

Друга теорія є більш вірогідною та стверджує, що включення ФТР у вірусну РНК спричиняє високий рівень геномних мутацій, що призводить до зменшення інфекційності або до утворення нижиттєздатних віріонів, ще більш пригнічуючи розмноження вірусу [16]. Схожий механізм дії спостерігається у молнупіравіру, який було розглянуто вище.

У популяціях вірусів, вирощених у присутності препарату, спостерігається 3-кратне збільшення загальної частоти мутацій у порівнянні зі зразками без застосування препарату, а також 12-кратне збільшення числа

мутацій, в яких гуанозин (G) був замінений на аденозин (A), а цитозин (C) на урацил (U). FTP переважно діє як аналог гуанозину [17].

Збільшення різноманітності популяції варіантів вірусу свідчить про те, що після включення у вірусну РНК препарат діє як мутаген, здатний уникнути механізму репарації вірусу.

Після потрапляння в клітину, фавіпіравір прикріплюється до активного сайту RdRp, де молекула препарату приєднується до 3' нуклеотиду праймерного ланцюга, і формує неканонічну пару основ, завдяки своїй амідній групі та цитозину, що знаходиться в темплетному РНК-ланцюзі [18].

Взаємодія FTP з полімеразою є дуже схожа на взаємодію з GTP, а сайти розпізнавання залишків збігаються у багатьох РНК-вірусів. Це свідчить про те, що фавіпіравір може мати противірусну дію широкого спектру проти різних РНК-вірусів завдяки подібному механізму дії [16].

1.3.3 Нірматрелвір і ритонавір

Варто зазначити, що хоча нірматрелвір і ритонавір є окремими препаратами, які можуть застосовуватись окремо, у контексті лікування COVID-19 розглядати їх окремо неможливо.

Нірматрелвір і ритонавір входять до складу препарату під торговою назвою Paxlovid. Paxlovid – це препарат, який використовується для лікування COVID-19, особливо в легких та помірних випадках захворювання у пацієнтів із високим ризиком прогресування захворювання до важкого. Це пероральний противірусний препарат, розроблений американською фармацевтичною компанією Pfizer.

Нірматрелвір – це противірусний препарат, інгібітор основної протеази (Mpro, також відома як 3CLpro або nsp5 протеаза) SARS-CoV-2.

Нірматрелвір проявив противірусну активність проти SARS-CoV-2 у дослідженнях клітинних культур у варіантах Альфа, Бета, Гамма, Дельта, Лямбда, Мю та Омикрон. Бета-варіант був найменш сприйнятливим варіантом [19].

Нірматрелвір є оборотним ковалентним інгібітором, що демонструє наномолярну ефективність у пригніченні SARS-CoV-2 шляхом зв'язування та інгібування Mpro як *in vitro*, так і *in vivo* [23].

Основна протеаза (Mpro), яку також називають 3-хімотрипсиноподібною протеазою (3CLpro), відноситься до класу цистеїнових висококонсервативних гідролаз у β -коронавірусах. 3CLpro відіграє незамінну роль у реплікації вірусу та визнана ключовою мішенню для запобігання та лікування інфекційних захворювань, спричинених коронавірусом. У процесі розмноження вірусу основні протеази розщеплюють поліпротеїни в кількох місцях, утворюючи кілька функціональних білків [20].

Розщеплення великих поліпротеїнових ланцюгів за допомогою 3CLpro відбувається на залишку глутаміну каталітичною діадою Cys145–His41, у якій цистеїновий тіол функціонує як нуклеофіл у протеолітичному процесі. Розщеплення поліпротеїнів головною протеазою відбувається за допомогою універсального механізму реакції нуклеофільного типу [20].

Крім того, у ссавців, включаючи людей, мишей, щурів, свиней і мавп, відсутні гомологи Mpro. Таким чином, протеази ссавців не розпізнають послідовність Mpro, і інгібітор Mpro має менше побічних ефектів, ніж інші противірусні терапевтичні засоби для ссавців [23].

Дослідження *in vitro* продемонстрували, що нірматрелвір оборотно пригнічує Mpro залежно від часу [22].

Цитохром 3A4 (CYP3A4) є основним медіатором окислення нірматрелвіру в організмі людини [21]. Швидкий метаболізм нірматрелвіру знижує його ефективність.

Для підвищення ефективності, нірматрелвір діє в парі ритонавіром. Ритонавір інгібує метаболічний фермент CYP3A4, подовжуючи період напіврозпаду нірматрелвіру, а отже діє як фармакологічний підсилювач.

Також ритонавір є фармакокінетичним підсилювачем препаратів, які використовуються для лікування ВІЛ-інфекції, таких як дарунавір і лопінавір.

У пацієнтів швидкість метаболічного кліренсу нірматрелвіру у комбінації з ритонавіром у 3 рази нижча, ніж нірматрелвіру окремо. Одночасне застосування нірматрелвіру та ритонавіру призводить до приблизно 8-кратного збільшення концентрації нірматрелвіру в плазмі, що свідчить про те, що концентрація нірматрелвіру в крові підвищується ритонавіром [23].

Загальна концентрація препарату в плазмі крові складається з двох частин: вільної концентрації препарату в плазмі крові та концентрації препарату, зв'язаного з білками плазми. Саме вільна концентрація препарату в плазмі впливає на ефективність препарату.

Коли нірматрелвір застосовують у комбінації з ритонавіром, ритонавір займає сайти зв'язування білків плазми крові через його афінність [23]. Як наслідок, нірматрелвір не може бути повністю зв'язаним білками плазми, що призводить до підвищення вільної концентрації препарату та збільшення противірусної ефективності.

1.4 Метод молекулярної динаміки для дослідження міжмолекулярних взаємодій

Метод молекулярної динаміки (МД) – це метод обчислювального моделювання, який використовується для вивчення того, як атоми та молекули поведуться з часом. Завдяки чисельному розв'язанню рівнянь руху, отриманих із законів класичної механіки, цей метод передбачає рух атомів в системі.

В 1967 році французьким вченим Лу Верле було розроблено алгоритм чисельного інтегрування рівнянь руху, що ознаменувало початок розвитку методу молекулярної динаміки [24].

МД моделювання дозволяє досліджувати динамічну поведінку молекулярних систем, їхній енергетичний ландшафт, кінетику взаємодії та структурні зміни з часом.

Метод МД можна використовувати для дослідження широкого діапазону систем, від простих газів і рідин до складних біологічних макромолекул, таких як ліпідні мембрани, білки та нуклеїнові кислоти. Метод

покращує розуміння того як ці системи поведуться в різних умовах: за різних середовищ розчинників, тиску і температури, моделюючи їх поведінку на атомному рівні. Крім того, взаємодія білок-ліганд, кінетика згортання білка та процеси проникнення через мембрану можуть бути досліджені за допомогою моделювання.

Цей метод знайшов застосування у розробці нових лікарських засобів. Завдяки моделюванню взаємодії малих молекул і білка-мішені можна спрогнозувати спорідненість зв'язування та визначати перспективні препарати. Цей підхід до розробки прискорює процес скринінгу та зменшує час і витрати, пов'язані з використанням звичайних експериментальних підходів [25].

В основі моделювання лежить інтегрування рівнянь руху Ньютона, які керують динамікою атомів і молекул, а також силові поля, які описують міжатомні взаємодії.

GROMACS (GRONingen Machine for Chemical Simulations) — одна з найпопулярніших програм для моделювання молекулярної динаміки, відома своєю ефективністю, масштабованістю та великим набором функцій. Вона використовує такі методи, як інтегрування з перекрокуванням (англ. leapfrog integration) та «методи пошуку сусідів», щоб скоротити тривалість моделювання та ефективно аналізувати незв'язані взаємодії [26].

Одним з розповсюджених методів «пошуку сусідів» в методах симуляції молекулярної динаміки є метод «списку комірок» (англ. cell list method). В цьому методі загальна комірка розділяється на сітку з менших комірок, і кожному атому ставиться у відповідність та комірка, яка містить його координати. Під час симуляції, взаємодії між атомами розраховуються лише для пар атомів, що знаходяться в сусідніх комірках, або на відстані достатній для взаємодії. Зменшуючи кількість взаємодій, що розглядаються, досягається зменшення часу симуляції та необхідної обчислювальної потужності, особливо для нековалентних взаємодій.

У GROMACS параметри силового поля є критичними для правильного опису молекулярних взаємодій. Ковалентні зв'язки та кути між атомами характеризують за допомогою математичних функцій, отриманих із квантово-механічних розрахунків або експериментальних даних. Незв'язані взаємодії – сили Ван-дер-Ваальса та електростатичні взаємодії – описуються за допомогою спрощених функцій потенційної енергії, таких як потенціали Леннарда-Джонса та потенціали Кулона [27].

GROMACS моделює поведінку атомів ітераційно, тобто крок за кроком змінює положення атомів на основі сил, що діють на них. Кожен крок включає в себе декілька етапів: створення списку сусідів для кожного атома, обчислення сил та інтегрування рівнянь руху. Крок у часі – це інтервал між повторним розрахунком стану системи. Чим меншим є крок, тим точнішим буде моделювання, проте довшим і потребуватиме більших ресурсів [26].

Незважаючи на широке використання методу, моделювання МД має обмеження та недоліки. Одним з істотних недоліків є обчислювальні витрати, необхідні для моделювання масивних біомолекулярних систем.

1.5 Ціанінові (поліметинові) барвники

Ціанінові барвники є підкласом поліметинів, які містять непарну кількість метинових груп і гетероциклічні кінцеві групи на основі азоту. Широко використовувана класифікація барвників пов'язана з симетрією хромофора.

Симетричні барвники складаються з ідентичних гетероциклів, з'єднаних в одному положенні, тоді як несиметричні барвники складаються або з двох різних гетероциклів, або з двох ідентичних гетероциклів, з'єднаних у різних положеннях [29].

Ціанінові барвники належать до категорії складних органічних сполук, які мають дуже інтенсивні смуги спектру поглинання у видимій області спектра. Це сильне поглинання світла на певних довжинах хвиль робить розчини цих молекул яскраво забарвленими. Розчин барвника забарвлений в

колір, довжина хвилі якого не поглинається барвником. Завдяки цій властивості такі барвники знайшли широке застосування в науці та техніці.

Наприклад, цими барвниками фарбують пластмаси, тканини, волосся. На даний момент похідні ціанінів широко застосовуються для виготовлення барвників лазерного середовища, фотосенсибілізаторів і флуоресцентних зондів.

Через мінімальне пошкодження біозразків, втручання флуоресценції біомолекул і глибоке проникнення в тканини ці барвники чудово підходять для розробки флуоресцентних зондів.

Для більшості зареєстрованих ціанінових барвників довжини хвиль емісії флуоресценції знаходяться в довгохвильовій області видимого світла (Cu3: $\lambda_{ex} = 550$ нм, $\lambda_{em} = 570$ нм; Cu5: $\lambda_{ex} = 650$ нм, $\lambda_{em} = 670$ нм; Cu7: $\lambda_{ex} = 743$ нм, $\lambda_{em} = 767$ нм) [30].

Справжні ціанінові барвники мають два азотистих гетероциклічних кільця, що з'єднані ланцюгом атомів вуглецю.

Ціанінові барвники класифікуються відповідно до кількості метинових ($-CH=$) груп у ланцюзі між двома кільцями та природи присутнього кільцевого фрагмента. Якщо присутня одна метинова група, барвник є монометинціаніновим барвником або простим ціаніновим барвником. Барвник із 3 метиновими групами класифікується як триметинціаніновий барвник. Якщо присутні 5 метинових груп, такий барвник відомий як пентаметинціаніновий барвник, а барвники з 7 метиновими групами відомі як гептаметинціанінові барвники.

Модифікація білків, ДНК та інших біополімерів шляхом мічення їх малими репортерними молекулами стала дуже потужним інструментом дослідження в молекулярній біології. У цих методах невелика молекула зі спектральними властивостями, такими як здатність до флуоресценції або специфічність зв'язування, ковалентно або нековалентно зв'язують з біомолекулами. Взаємодія цих молекул з нуклеїновими кислотами надає сигнал, який можна виявити за допомогою спектрофотометру.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Отримання просторової структури молекул

Перш ніж приступити безпосередньо до методу моделювання молекулярної динаміки, було побудовано системи, які будуть аналізуватись в подальшому.

Кожна система складається з трьох компонентів: білок, лікарський препарат та барвник. У даному розділі наводиться підготовка системи лізоциму з фавіпіравіром та ціаніновим барвником АК5-6.

Підготовка та аналіз інших систем проводились за тими самими кроками, що наведені нижче.

Перший етап – це створення або завантаження файлів молекулярної структури та оптимізація геометрії молекул. Для підготовки системи використовувалися різні програмні інструменти та ресурси.

Структурний файл білка було завантажено з бази даних PDB.

The screenshot displays the RCSB PDB website interface. At the top, there is a navigation bar with links for Deposit, Search, Visualize, Analyze, Download, Learn, About, Documentation, Careers, and COVID-19. Below this, the PDB logo and statistics are shown: 220,113 Structures from the PDB and 1,068,577 Computed Structure Models (CSM). A search bar is present with the text 'Enter search term(s), Entry ID(s), or sequence'. Below the search bar, there are tabs for Structure Summary, Structure, Annotations, Experiment, Sequence, Genome, and Versions. The main content area shows the entry for 1IY4, titled 'Solution structure of the human lysozyme at 35 degree C'. It includes the PDB DOI, Classification (HYDROLASE), Organism(s) (Homo sapiens), Expression System (Komagataella pastoris), and Mutation(s) (No). The Experimental Data Snapshot section provides details on the method (SOLUTION NMR), conformers calculated (20), and selection criteria. A Macromolecule Content section lists the total structure weight (14.72 kDa), atom count (1,027), modelled residue count (130), deposited residue count (130), and unique protein chains (1).

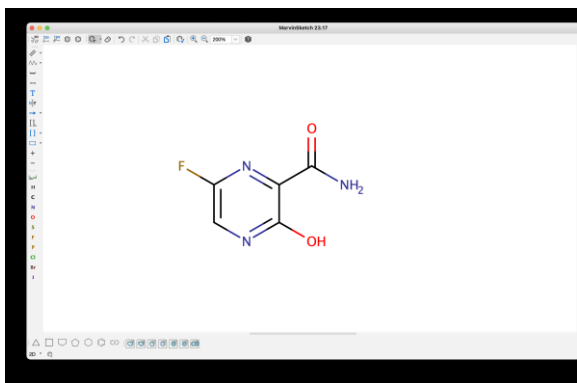
Рис 2.1 База даних PDB: білок з кодом 1IY4 – людський лізоцим, що отриманий методом рентгенівської кристалографії у розчині за температури 35°C.

PDB (Protein Data Bank) – це загальнодоступна база даних тривимірних структур біологічних макромолекул, таких як білки, нуклеїнові кислоти та комплекси білків з іншими молекулами. База даних містить інформацію про просторову організацію молекул, що отримана за допомогою методів рентгенівської кристалографії, ядерного магнітного резонансу (ЯМР) та криоелектронної мікроскопії [31].

Молекулярна структура лікарських засобів та барвників є значно простішою ніж у білка. Файли їх тривимірної структури були побудовані власноруч у програмному забезпеченні MarvinSketch, яке дозволяє зручно та гнучко будувати невеликі молекуди лігандів.

На рисунку 2.2 продемонстровано процес побудови молекули фавіпіравіру в програмі MarvinSketch. Програма дозволяє намалювати спрощену структуру молекули на площині, після чого перевести цю структуру у тривимірну та додати атоми Гідрогену, яких не вистачає.

А



Б

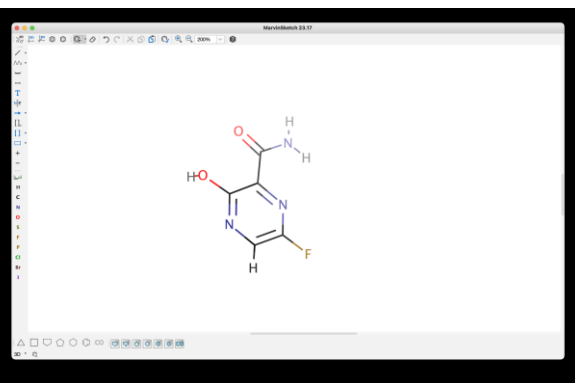


Рис. 2.2 Побудова фавіпіравіру у програмному забезпеченні MarvinSketch. Спрощена структура молекули на площині (А) та повна тривимірна структура молекули (Б).

Однак тривимірну структуру молекули необхідно оптимізувати, використовуючи додаткове програмне забезпечення. Одним з таких є програма Avogadro.

Avogadro – це програмне забезпечення для редагування та візуалізації молекулярних структур. Воно дозволяє створювати та редагувати молекули, візуалізувати їх у тривимірному просторі, оптимізувати геометрію, а також взаємодіє з іншими програмами для квантово-хімічних розрахунків [32].

Структуру побудовану у MarvinSketch було збережено у форматі .mrv, який розпізнається програмою Avogadro. Після цього було проведено додаткову оптимізацію тривимірної структури молекули.

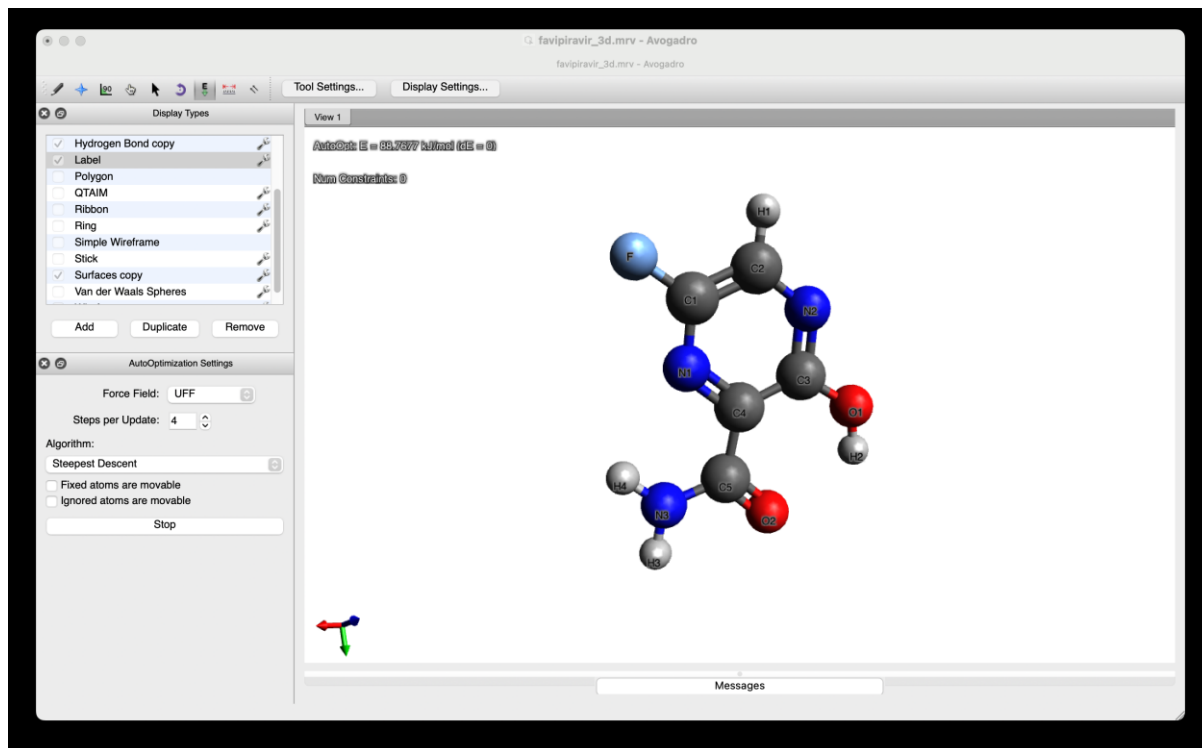


Рис. 2.3 Оптимізація тривимірної структури фавіпіравіру у програмі Avogadro. Оптимізація проводилась за допомогою силового поля UFF.

Ті самі кроки були зроблені при побудові просторової структури молекули ціанінового барвника АК5-6. Спершу барвник було побудовано у MarvinSketch (рис. 2.4), а далі було оптимізовано геометрію молекули в програмі Avogadro.

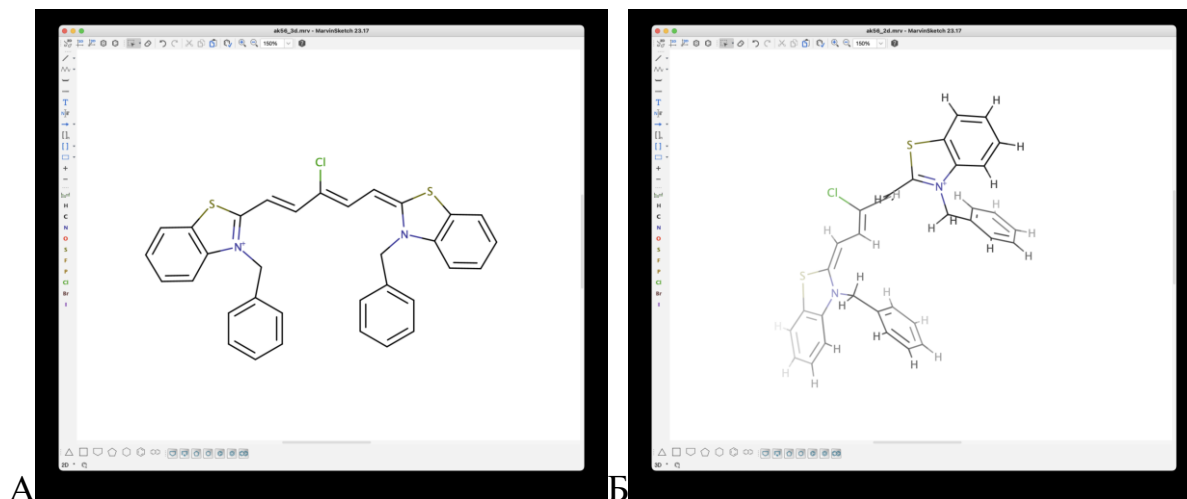


Рис. 2.4 Побудова барвника АК5-6 у MarvinSketch. Спрощена структура барвника (А) та повна тривимірна (Б).

2.2 Підготовка системи до моделювання

Вхідні файли для моделювання у програмному пакеті GROMACS були отримані за допомогою веб-ресурсу CHARMM-GUI. Ця платформа призначена для інтерактивної побудови складних систем та підготовки вхідних файлів для багатьох широко розповсюджених пакетів моделювання молекулярної динаміки, таких як CHARMM, GROMACS, NAMD тощо [33].

Рис 2.6 Веб-платформа CHARMM-GUI, що використовується для генерування вхідних файлів пакету GROMACS.

Система, що включає білки та ліганди, була розміщена у водному середовищі з додаванням іонів Na^+ і Cl^- для нейтралізації зарядів молекул, таким чином, забезпечуючи електронейтральність системи. Положення іонів у водному середовищі було визначено за допомогою методу Монте-Карло. Температура системи була встановлена на рівні 310 K, що приблизно відповідає середній температурі тіла людини (37°C).

Результатом є папка `gromacs`, яка містить всі необхідні файли для подальшого комп'ютерного моделювання у програмному пакеті GROMACS.

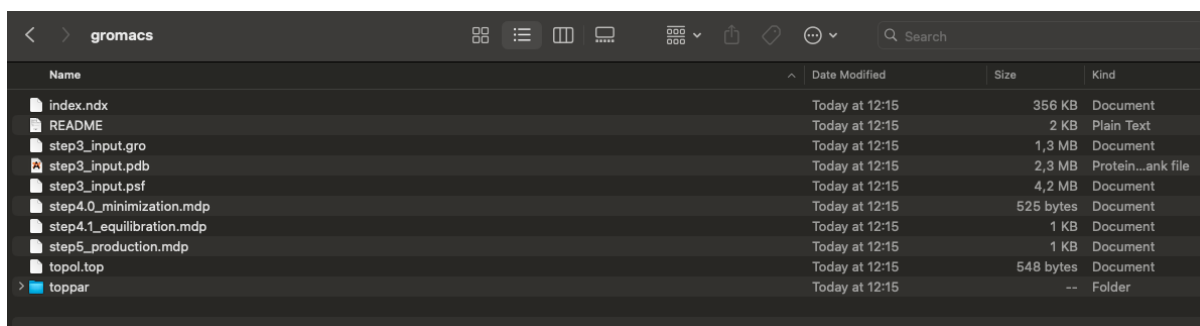


Рис 2.9 Папка із завантаженими файлами, необхідними для роботи в GROMACS

Файли `step4.0_minimization.mdp`, `step4.1_equilibration.mdp` та `step5.0_production.mdp` відіграють ключові ролі у різних етапах молекулярного моделювання. Кожен з цих файлів містить параметри для різних стадій симуляції і має специфічні функції, що забезпечують правильну підготовку та виконання моделювання. Також у цих файлах встановлюються налаштування моделювання, такі як крок інтегрування.

Файли топології, які знаходяться у папці `toppar`, відіграють важливу роль. Ці файли містять інформацію про молекулярні структури та взаємодії в системі, яка моделюється. Вони необхідні для коректного виконання симуляцій молекулярної динаміки, оскільки забезпечують детальну описову структуру системи, включаючи типи атомів, зв'язки між ними, кути, заряд на атомах, а також параметри для розрахунку силових полів.



Рис. 2.10 Файли топології системи отримані за допомогою CHARMM-GUI

Процедура коригування зарядів була виконана за допомогою RedServer. RedServer (RESP ESP charge Derive Server) — це веб-сервіс, призначений для розрахунку зарядів на атомах молекул за допомогою різних методів, зокрема методів RESP (Restrained Electrostatic Potential) і ESP (Electrostatic Potential). Цей сервер є корисним інструментом оскільки дозволяє точно визначати розподіл заряду в молекулах, що є критично важливим для багатьох типів симуляцій і теоретичних розрахунків.

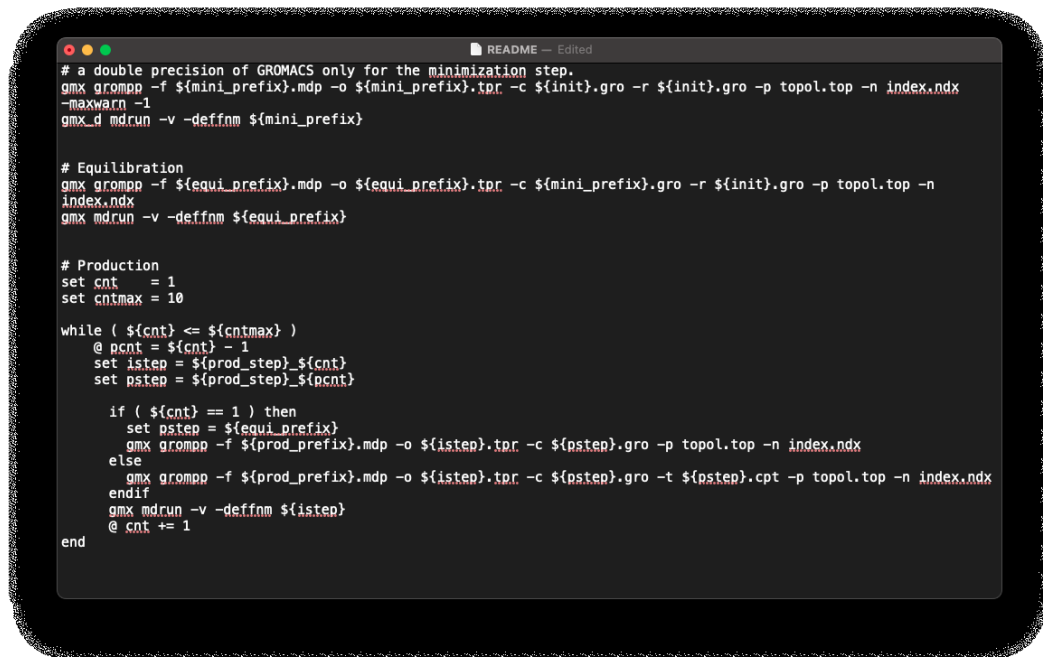
RESP є методом, який використовується для отримання електростатичних потенціалів, що дозволяє визначати розподіл заряду на атомах молекул. Цей метод враховує геометрію молекули та її електростатичні властивості, забезпечуючи точний розрахунок зарядів, які можуть бути використані в молекулярній динаміці.

2.3 Моделювання молекулярної динаміки

Як зазначалося раніше, моделювання МД проводилося з використанням середовища GROMACS. Процес моделювання є досить прямолінійним, хоча він вимагає значного часу, оскільки такі обчислення потребують великої кількості обчислювальних ресурсів.

У директорії gromacs, отриманій на попередньому етапі, міститься файл README, де можна знайти докладні інструкції та команди для запуску

процедур мінімізації енергії, врівноваження системи та розрахунку молекулярної динаміки у силовому полі CHARMM36.



```

# a double precision of GROMACS only for the minimization step.
gmx grompp -f ${mini_prefix}.mdp -o ${mini_prefix}.tpr -c ${init}.gro -r ${init}.gro -p topol.top -n index.ndx
-maxwarn -1
gmx_d mdrun -v -deffnm ${mini_prefix}

# Equilibration
gmx grompp -f ${equi_prefix}.mdp -o ${equi_prefix}.tpr -c ${mini_prefix}.gro -r ${init}.gro -p topol.top -n
index.ndx
gmx mdrun -v -deffnm ${equi_prefix}

# Production
set cnt = 1
set cntmax = 10

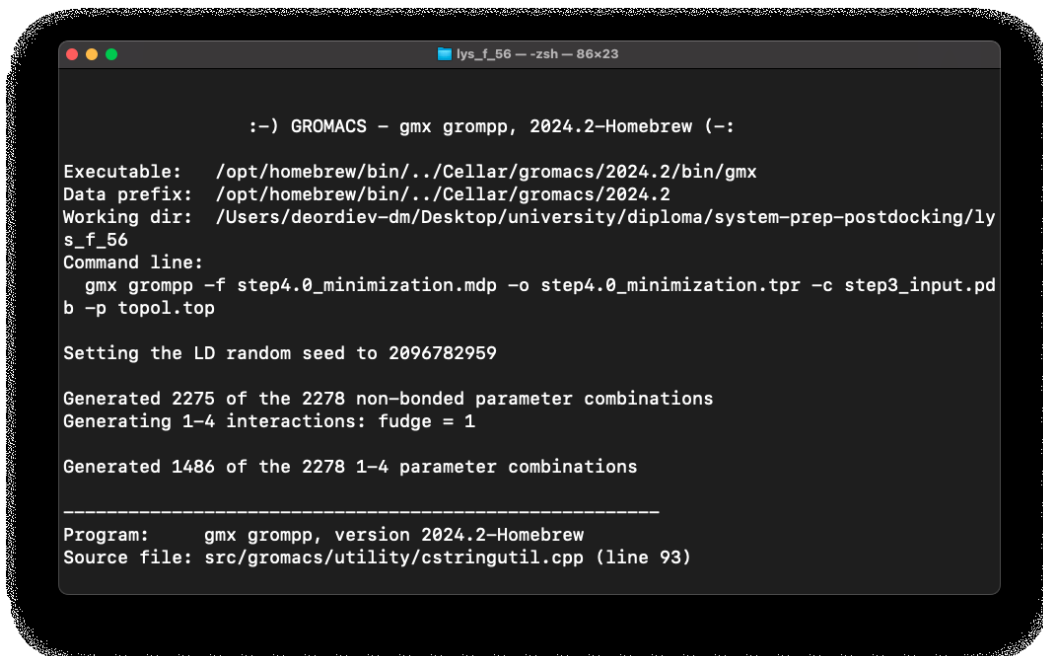
while ( ${cnt} <= ${cntmax} )
@ cnt = ${cnt} - 1
set istep = ${prod_step}.${cnt}
set pstep = ${prod_step}.${cnt}

if ( ${cnt} == 1 ) then
set pstep = ${equi_prefix}
gmx grompp -f ${prod_prefix}.mdp -o ${istep}.tpr -c ${pstep}.gro -p topol.top -n index.ndx
else
gmx grompp -f ${prod_prefix}.mdp -o ${istep}.tpr -c ${pstep}.gro -t ${pstep}.cpt -p topol.top -n index.ndx
endif
gmx mdrun -v -deffnm ${istep}
@ cnt += 1
end

```

Рис 2.11 Команди для запуску моделювання в програмному пакеті GROMACS.

Для виконання вказаних команд необхідно відкрити термінал у директорії gromacs, де знаходяться всі необхідні файли для розрахунків, і послідовно ввести команди, які запускають процеси мінімізації енергії, врівноваження системи та проведення молекулярної динаміки.



```

lsys_f_56 -- zsh -- 86x23

:~) GROMACS - gmx grompp, 2024.2-Homebrew (-:

Executable: /opt/homebrew/bin/./Cellar/gromacs/2024.2/bin/gmx
Data prefix: /opt/homebrew/bin/./Cellar/gromacs/2024.2
Working dir: /Users/deordiev-dm/Desktop/university/diploma/system-prep-postdocking/ly
s_f_56
Command line:
gmx grompp -f step4.0_minimization.mdp -o step4.0_minimization.tpr -c step3_input.pd
b -p topol.top

Setting the LD random seed to 2096782959

Generated 2275 of the 2278 non-bonded parameter combinations
Generating 1-4 interactions: fudge = 1

Generated 1486 of the 2278 1-4 parameter combinations

-----
Program: gmx grompp, version 2024.2-Homebrew
Source file: src/gromacs/utility/cstringutil.cpp (line 93)

```

Рис 2.12 Процес мінімізації енергії системи у програмному пакеті GROMACS.

На першому етапі здійснюється мінімізація енергії системи для видалення небажаних високих енергетичних конфігурацій. Врівноваження системи проводиться у два етапи: врівноваження при постійній температурі (NVT) та врівноваження при постійному тиску (NPT). Після успішного врівноваження системи виконується основний розрахунок молекулярної динаміки.

В результаті виконання зазначених розрахунків програма GROMACS згенерує кілька файлів, зокрема файли траєкторії молекул упродовж часу моделювання.

GROMACS за допомогою вбудованих утиліт дозволяє розрахувати додаткові важливі динамічні характеристики системи: середньоквадратичне відхилення атомів (RMSD), середньоквадратичну флуктуацію (RMSF) та радіус інерції (Rg).

RMSD (Root Mean Square Deviation) — це міра середнього відхилення атомів від початкової конфігурації (зазвичай відносно початкової структури) у часі. RMSD використовується для оцінки змін конформації молекули протягом симуляції МД. Це значення застосовується для порівняння структури білка у різні моменти часу [34].

RMSF (Root Mean Square Fluctuation) — це міра середньої флуктуації кожного атома навколо його середнього положення протягом симуляції. RMSF дозволяє оцінити гнучкість або динамічну рухливість окремих частин молекули.

Rg (Radius of Gyration) - це міра розподілу атомів навколо центру мас молекули. Радіус інерції використовується для оцінки компактності або ступеня розширеності молекули, наприклад, для вивчення розгортання та згортання білків [35].

Отримані дані були використані для подальшого аналізу поведінки системи та вивчення динаміки молекул.

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Загалом у роботі досліджено 24 молекулярні системи. У кожній системі присутній один з двох білків: інсулін або лізоцим; один з чотирьох лікарських засобів: молнупіравір, фавіпіравір, нірматрелвір або ритонавір; один з трьох ціанінових барвників: АК3-11, АК5-6, АК7-5.

Було проведено комп'ютерне молекулярне моделювання всіх систем на проміжку часу у 5нс, а також додатково на 100нс для трьох систем з кроком інтегрування 0,002 нс.

Комп'ютерне молекулярне моделювання включало аналіз взаємодії між білками, лікарськими засобами та барвниками, що дозволяє зрозуміти механізми їхньої взаємодії та можливі біологічні наслідки. Зокрема, особливу увагу було приділено стабільності утворених комплексів та динаміці змін конформації молекул. Проведення моделювання на тривалий час для деяких систем дозволило отримати більш детальну інформацію про поведінку молекул.

На початковому етапі аналізу було проведено відбір систем, у яких ліганди віддалялися від білка на значну відстань, оскільки такі системи є нестабільними і не підлягають подальшому аналізу.

Відбір здійснювався візуально за допомогою програмного забезпечення VMD. Візуалізація, виконана за допомогою VMD, дозволила наочно продемонструвати зміни у взаємодії лігандів з білками.

Порівняльний аналіз поведінки систем наведено в таблицях 3.1 та 3.2, причому оцінка була виконана виключно для систем з часом симуляції 5 нс.

Таблиця 3.1 Поведінка систем з інсуліном

Система	Поведінка з часом
Фавіпіравір + АК3-11	Лікарський препарат віддалився від білка
Фавіпіравір + АК5-6	Лікарський препарат віддалився від білка

Фавіпіравір + АК7-5	Лікарський препарат віддалився від білка
Ритонавір + АК3-11	Лікарський препарат віддалився від білка
Ритонавір + АК5-6	Ліганди не віддалялись від білка
Ритонавір + АК7-5	Лікарський препарат віддалився від білка
Нірматрелвір + АК3-11	Ліганди не віддалялись від білка
Нірматрелвір + АК5-6	Ліганди не віддалялись від білка
Нірматрелвір + АК7-5	Ліганди не віддалялись від білка
Молнупіравір + АК3-11	Лікарський препарат віддалився від білка
Молнупіравір + АК5-6	Лікарський препарат віддалився від білка
Молнупіравір + АК7-5	Обидва ліганди віддалились від білка

Таблиця 3.2 Поведінка систем з лізоцимом

Система	Поведінка з часом
Фавіпіравір + АК3-11	Лікарський препарат відділився від білка
Фавіпіравір + АК5-6	Лікарський препарат відділився від білка
Фавіпіравір + АК7-5	Лікарський препарат відділився від білка
Ритонавір + АК3-11	Ліганди не відділялись від білка
Ритонавір + АК5-6	Ліганди не відділялись від білка
Ритонавір + АК7-5	Ліганди не відділялись від білка
Нірматрелвір + АК3-11	Лікарський препарат відділився від білка
Нірматрелвір + АК5-6	Ліганди не відділялись від білка
Нірматрелвір + АК7-5	Ліганди не відділялись від білка
Молнупіравір + АК3-11	Ліганди не відділялись від білка
Молнупіравір + АК5-6	Ліганди не відділялись від білка
Молнупіравір + АК7-5	Ліганди не відділялись від білка

З 12 проаналізованих систем з інсуліном, у 8 системах ліганди віддалялися від білка, що свідчить про нестабільність цих комплексів. Лише 4 системи зберегли стабільність, де ліганди залишалися зв'язаними з білком.

З 12 проаналізованих систем з лізоцимом, 4 системи продемонстрували, що ліганди віддалялися від білка. Інші 8 систем залишалися стабільними.

Фавіпіравір демонструє нестабільність в обох білках, що вказує на його низьку афінність до цих білків. Ритонавір виявився стабільним у взаємодії з лізоцимом, але має змішані результати в зв'язуванні з інсуліном. Нірматрелвір показує високу стабільність з інсуліном і переважно стабільний з лізоцимом. Молнупіравір стабільний з лізоцимом, але демонструє погані результати у взаємодії з інсуліном.

Розглянемо кожен з систем більш детально.

А. 0 нс

Б. 3 нс

В. 5 нс

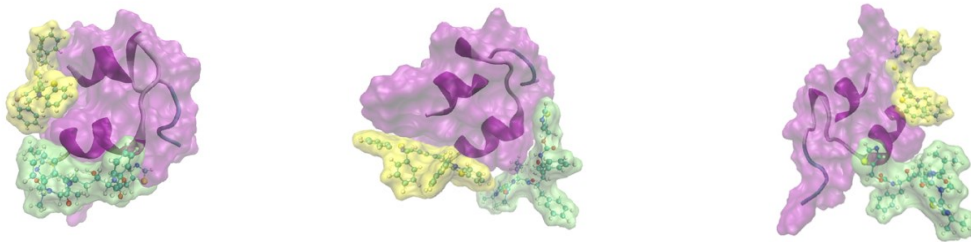


Рис 3.1 Часова еволюція системи інсулін + ритонавір + АК5-6

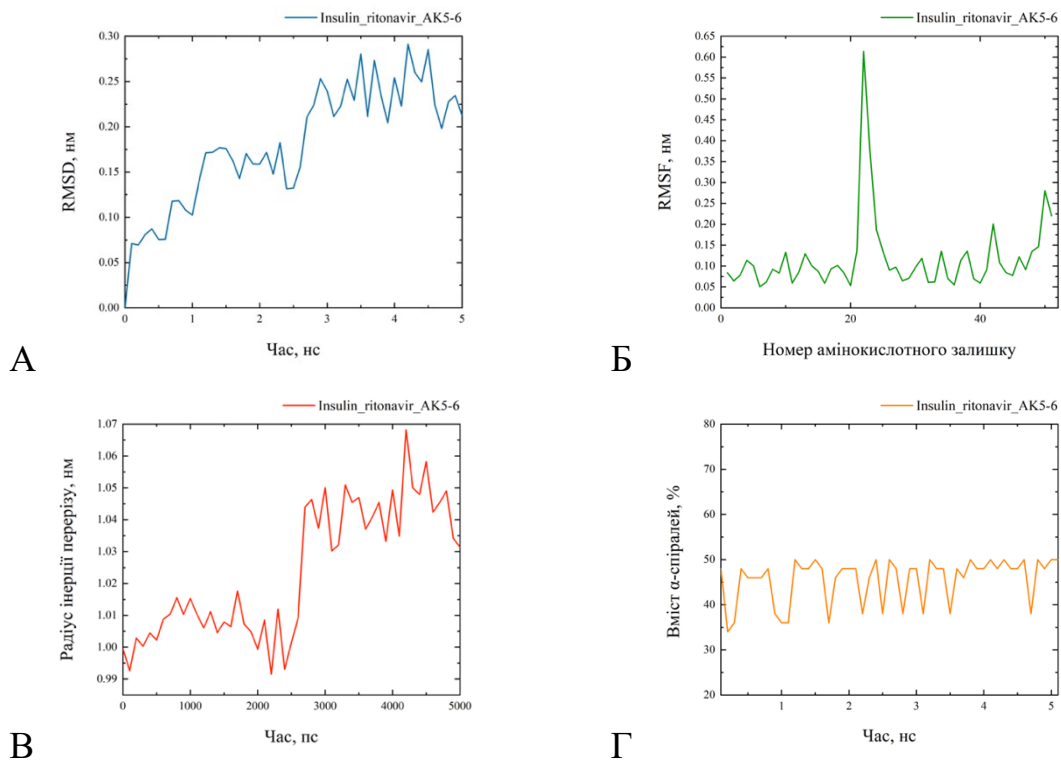


Рис. 3.2 Залежність RMSD (А), Rg (В) та вмісту альфа-спіралей у структурі білка (Г) від часу, RMSF (Б) від номеру амінокислотного залишку

На рис 3.2(A) можемо побачити, що значення RMSD для системи не перевищувало 0,3нм. При чому спостерігається різке збільшення як RMSD, так і Rg з моменту 2,5нс, що означає більшу відмінність від початкової конфігурації. Відповідно, на рис. 3.1(B) помітно, що білок суттєво змінив свою конформацію з глобулярної на більш витягнуту. Варто відзначити, що найбільших флуктуацій зазнали 20-25 амінокислотні залишки (рис 3.2(B)).

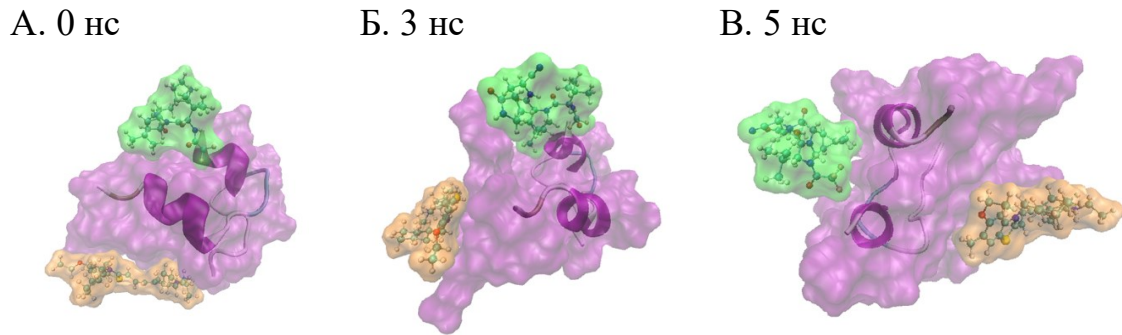


Рис 3.3 Часова еволюція системи інсулін + нірматрелвір + АК3-11

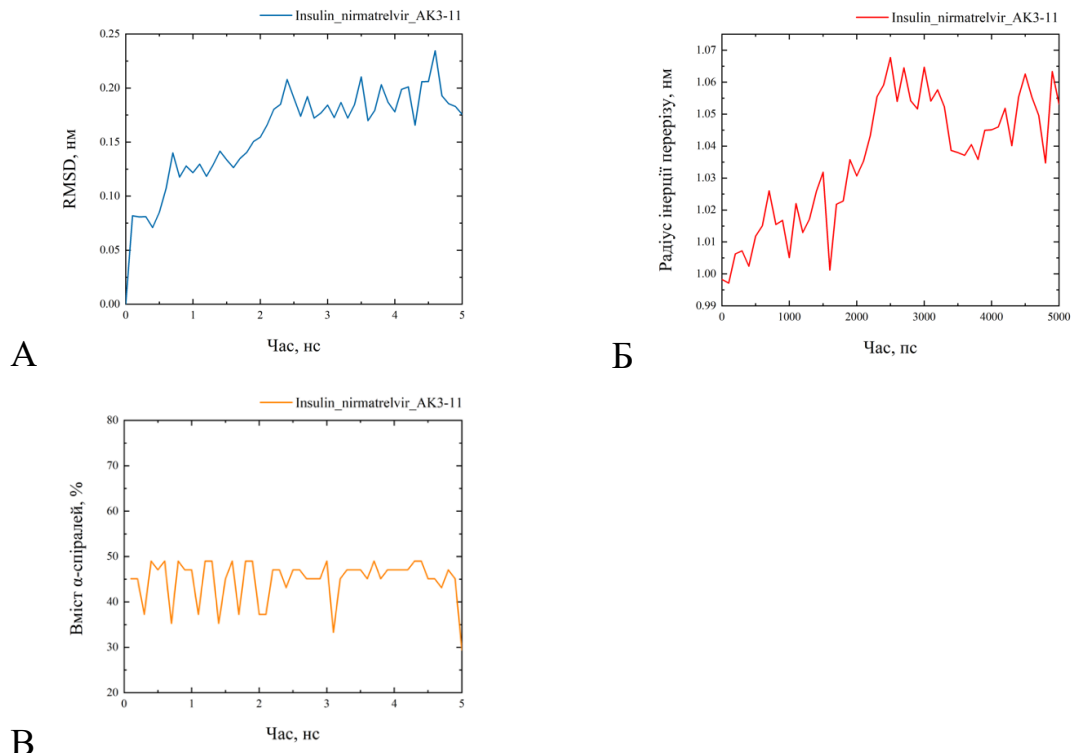


Рис. 3.4 Залежність RMSD (А), Rg (Б) та вмісту альфа-спіралей у структурі білка (В) від часу

Ця система має краще значення RMSD, яке не перевищувало значення 0,25 нм. Спостерігається схожий тренд збільшення зміни конформації білка з часом. В момент часу близько 1,5 нс відбулась різка зміна значення Rg – білок став менш компактним. Проте вміст альфа-спіралей коливався незначно і знаходився у межах 30-50%.

А. 0 нс

Б. 3 нс

В. 5 нс

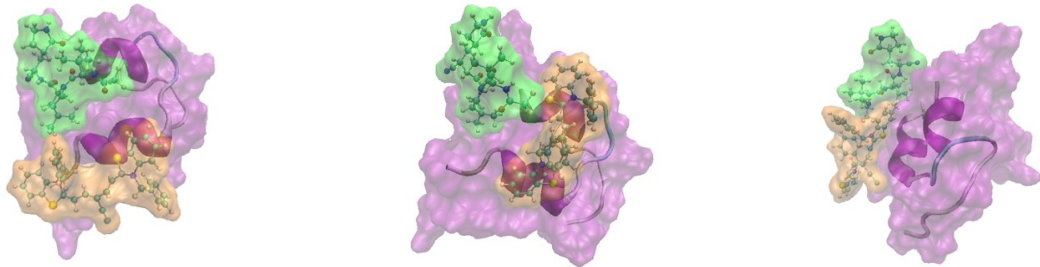


Рис 3.5 Часова еволюція системи інсулін + нірматрелвір + АК5-6

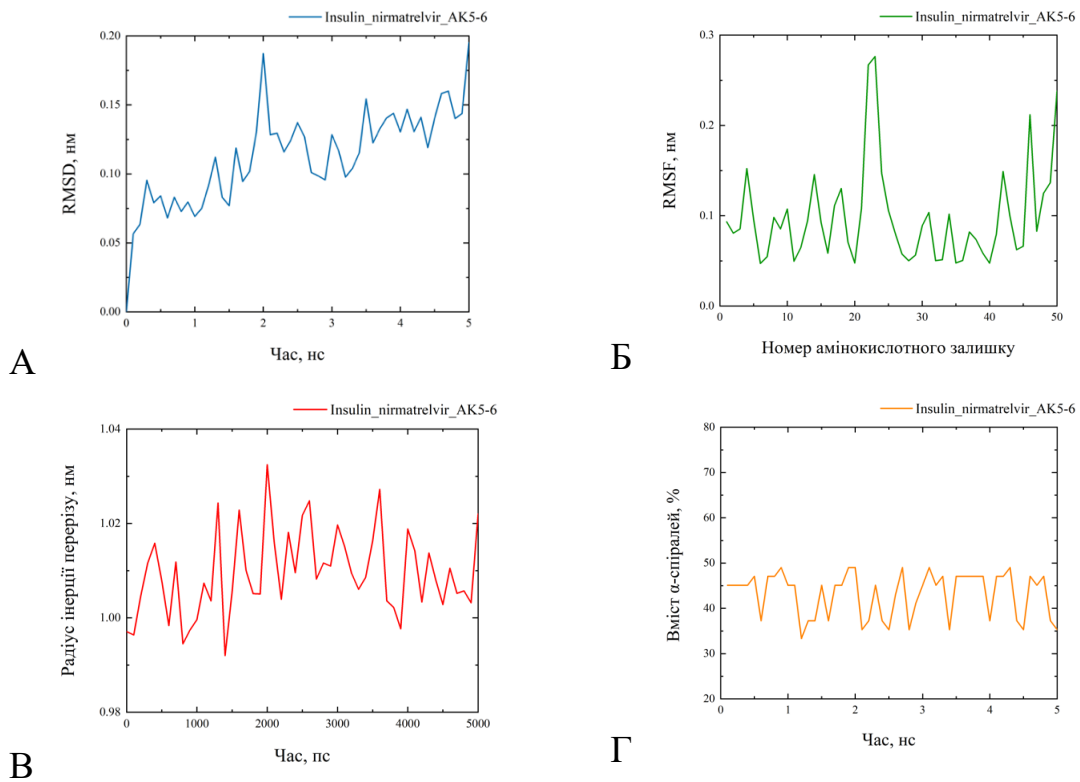


Рис. 3.6 Залежність RMSD (А), Rg (В) та вмісту альфа-спіралей у структурі білка (Г) від часу, RMSF (Б) від номеру амінокислотного залишку

Система продемонструвала краще значення RMSD, яке не перевищувало відмітки у 0,2 нм з трендом на збільшення значення з часом.

Значення R_g також виявилось більш стабільним, ніж у попередніх системах. На снапшотах (рис 3.5) можна побачити, що білок здебільшого зберіг свою глобулярну структуру. Найбільший внесок у флуктуації знову внесли залишки 20-25.

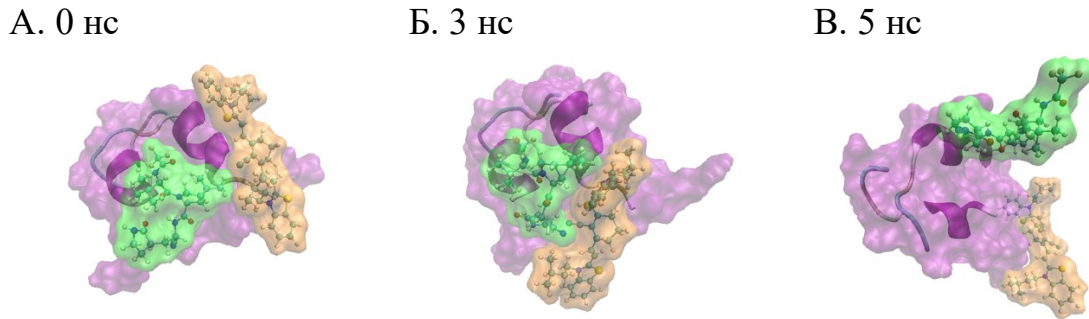


Рис 3.7 Часова еволюція системи інсулін + нірматрелвір + АК7-5

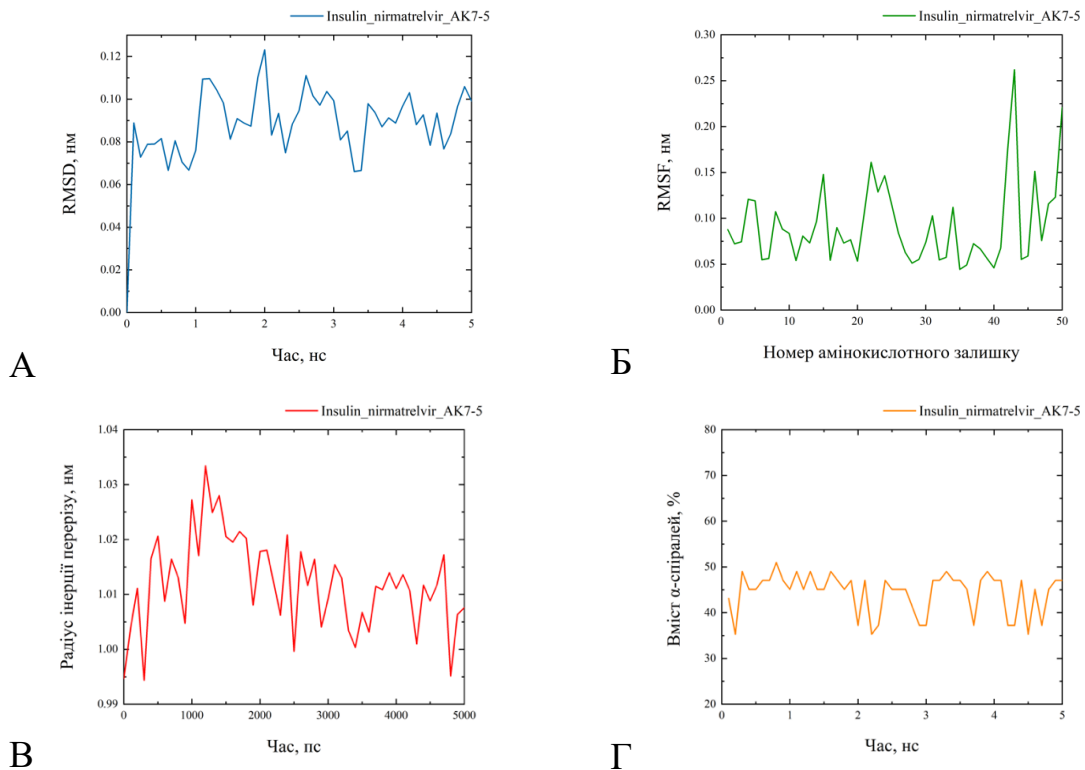


Рис. 3.8 Залежність RMSD (А), R_g (В) та вмісту альфа-спіралей у структурі білка (Г) від часу, RMSF (Б) від номеру амінокислотного залишку

Дана система має найменше та найстабільніше значення RMSD серед всіх систем з інсуліном. RMSD коливалося у межах від 0,06 до 0,12 нм. При цьому Rg також було вкрай стабільним, з піковим значенням менш ніж 1,04 нм та тенденцією на подальше зменшення. На снапшотах (рис. 3.7) помітно, що білок змінював свою структуру несуттєво. В зміни конформації основний внесок внесли кінцеві АК залишки.

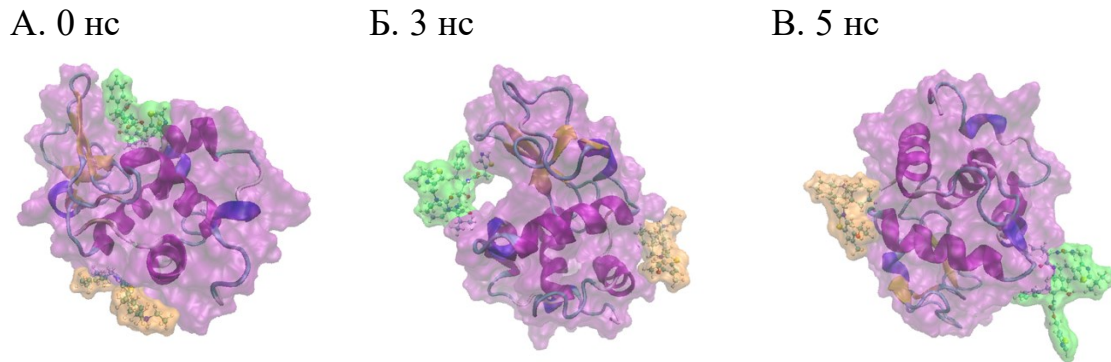


Рис 3.9 Часова еволюція системи лізоцим + ритонавір + АК3-1

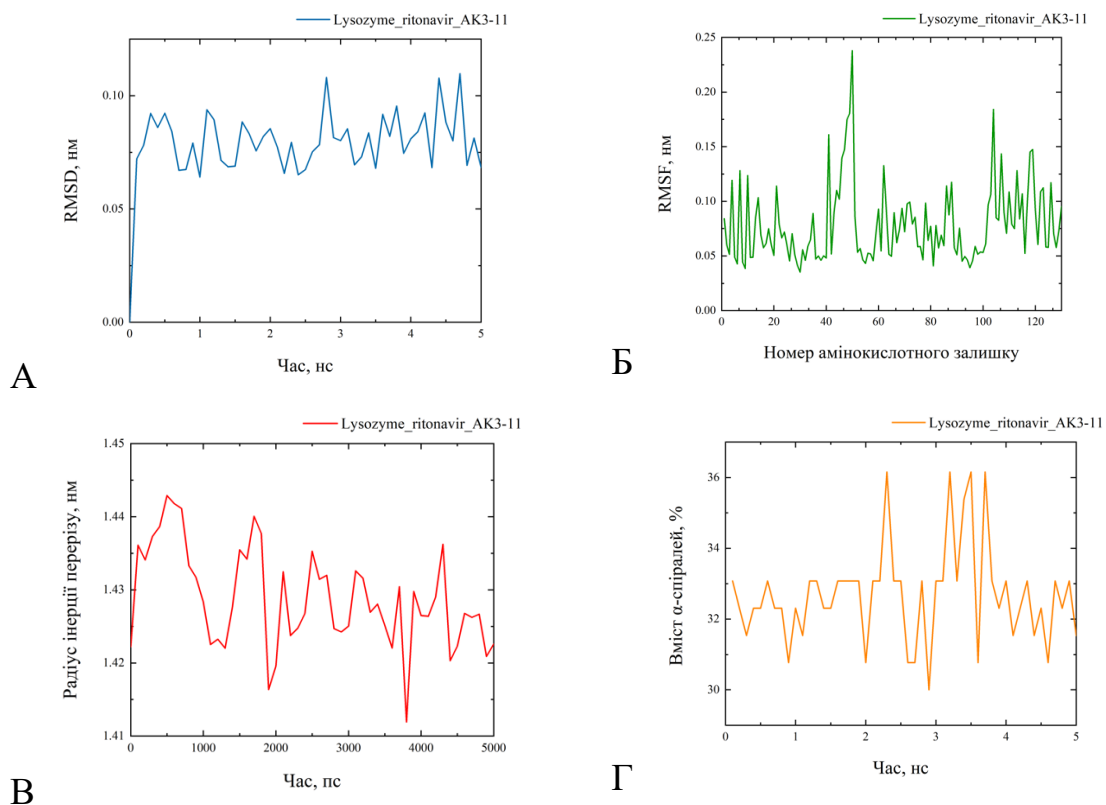


Рис. 3.10 Залежність RMSD (А), Rg (В) та вмісту альфа-спіралей у структурі білка (Г) від часу, RMSF (Б) від номеру амінокислотного залишку

Перша з відібраних система з лізоцимом має гарне значення RMSD – білок змінює свою конформацію несуттєво в порівнянні з початковою. При цьому значення є стабільним. Значення Rg стає меншим, що означає, що білок не розгортається, а навпаки стає компактнішим. Вторинна структура залишалась стабільною протягом всього часу.

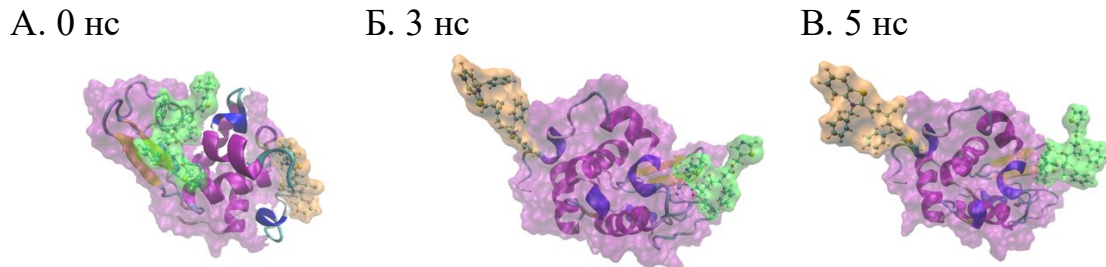


Рис 3.11 Часова еволюція системи лізоцим + ритонавір + АК5-6

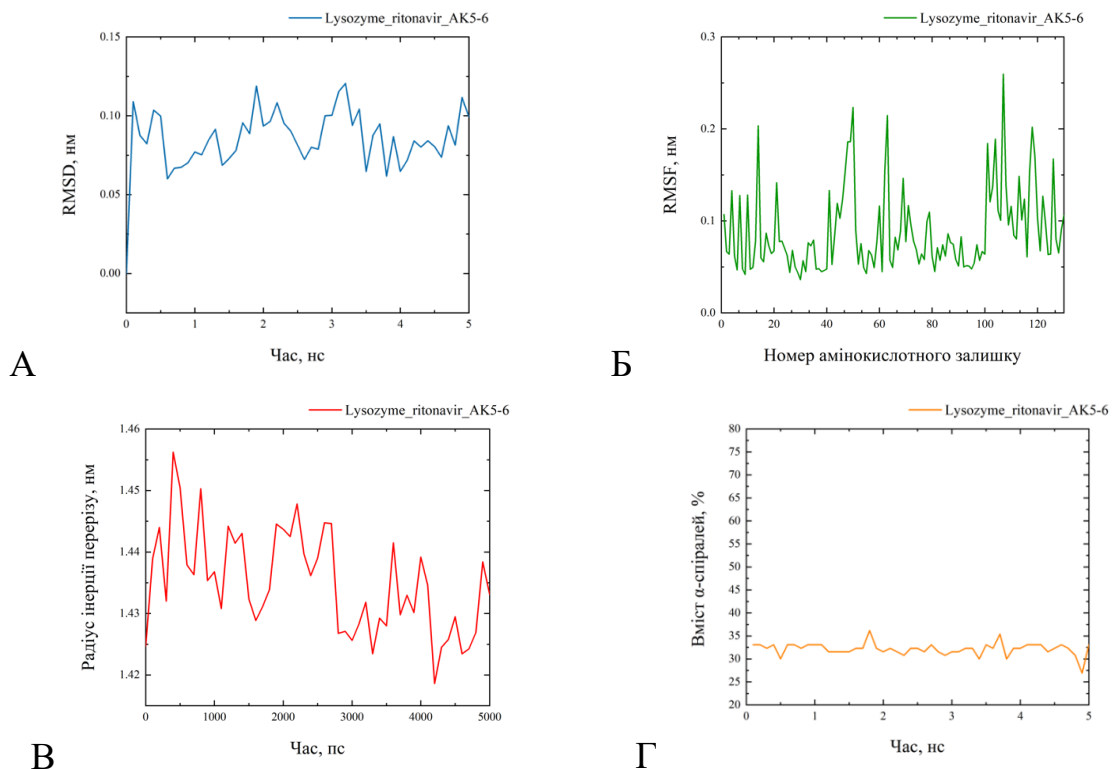


Рис. 3.12 Залежність RMSD (А), Rg (В) та вмісту альфа-спіралей у структурі білка (Г) від часу, RMSF (Б) від номеру амінокислотного залишку

Система з іншим барвником є теж доволі стабільною, хоча показники є трохи більшими ніж в попередній системі. Загалом, величина RMSD коливається несуттєво та не перевищує 0,13нм. Підмітимо, що білок так само має тенденцію до поступового згортання – значення Rg падає з 1,455 до 1,42 нм в кінці симуляції. Вміст альфа-спіралей протягом 5нс є стабільним з невеликим зменшенням значення в кінці.

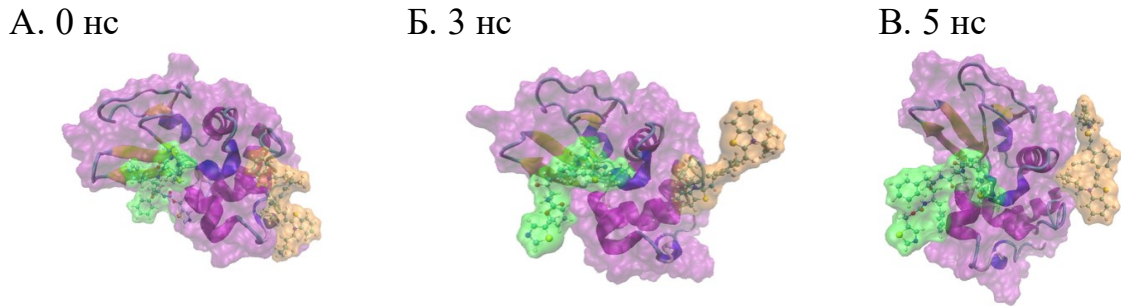


Рис 3.13 Часова еволюція системи лізоцим + ритонавір + АК7-5

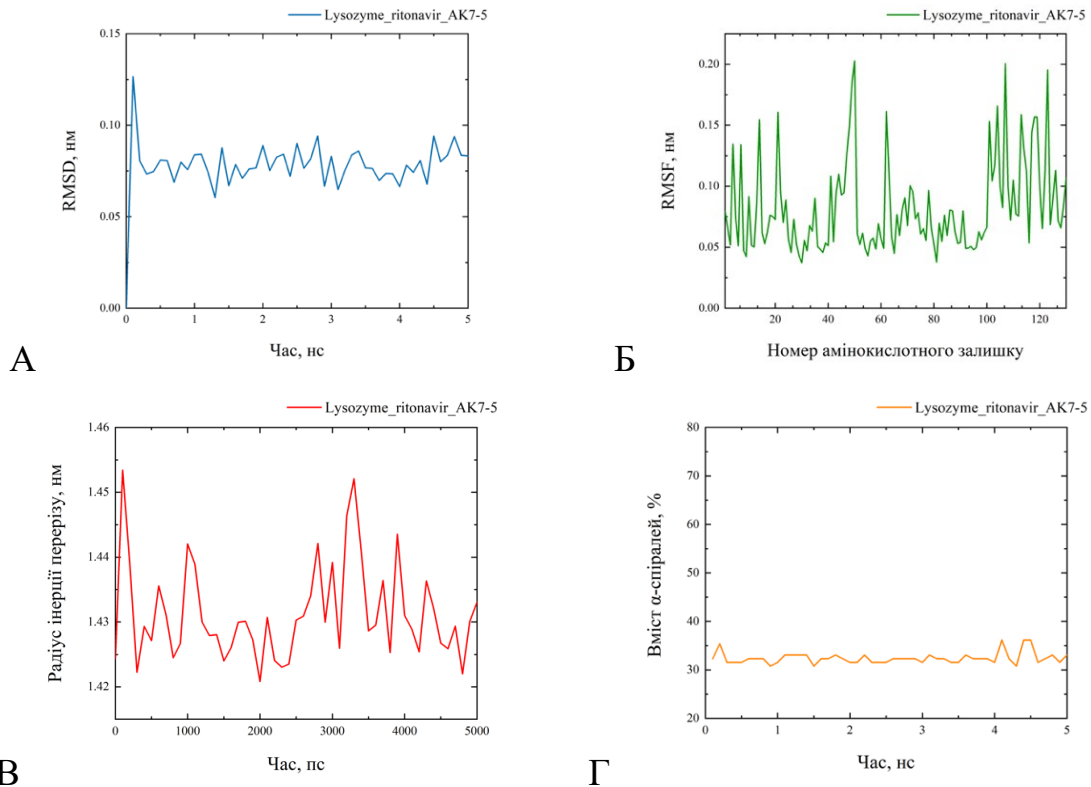


Рис. 3.14 Залежність RMSD (А), Rg (В) та вмісту альфа-спіралей у структурі білка (Г) від часу, RMSF (Б) від номеру амінокислотного залишку

Система з АК7-5 має виражений пік у значеннях RMSD та Rg в перші моменти симуляції. Це означає, що білок різко швидко змінив свою конформацію. Однак згодом обидва значення стабілізуються. Наприклад, величина RMSD була менша за 0,1 нм майже увесь час симуляції, що є найкращим результатом серед усіх систем лізоцим-ритонавір. Також помітимо, що для даної системи Rg має другий виражений пік, на відміну від інших систем.

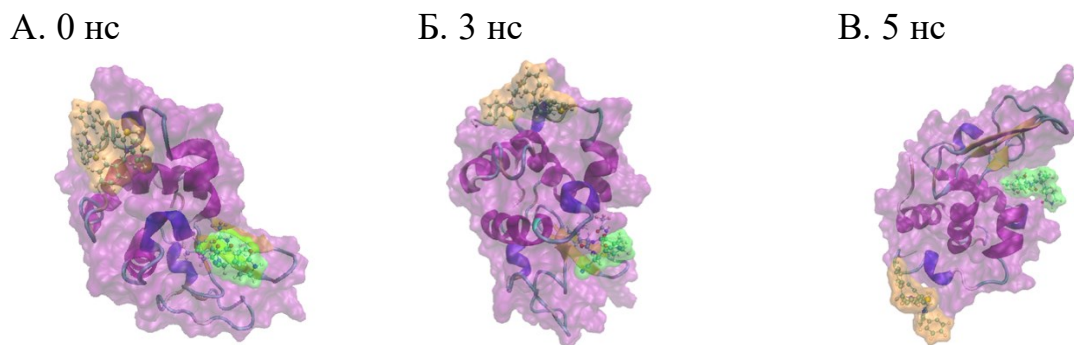


Рис 3.15 Часова еволюція системи лізоцим + нірматрелвір + АК5-6

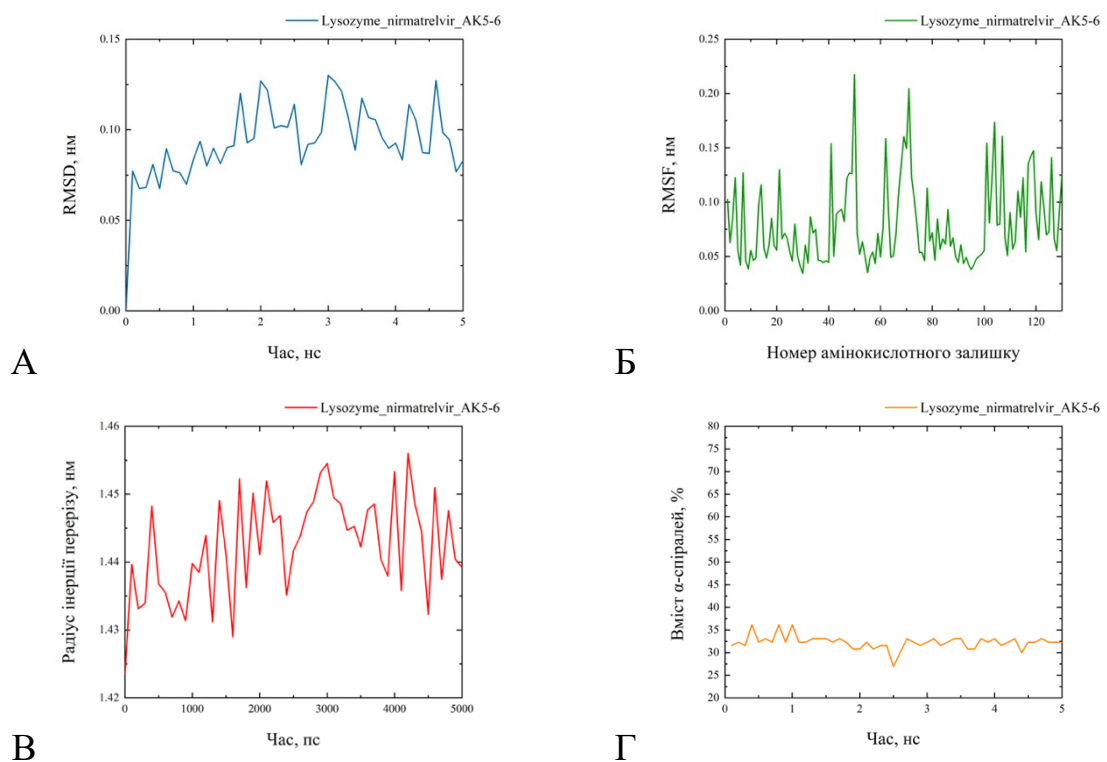


Рис. 3.16 Залежність RMSD (А), Rg (В) та вмісту альфа-спіралей у структурі білка (Г) від часу, RMSF (Б) від номеру амінокислотного залишку

Система з нїрматрелвіром та АК-5-6 має значення RMSD вище за попередні значення для лізоциму. На моменті часу 1,5 нс значення збільшується до 0,13нм та залишається високим до кінця симуляції. Rg не має тенденції до зменшення. Значення переважно знаходиться на відмітці 1,455 нм.

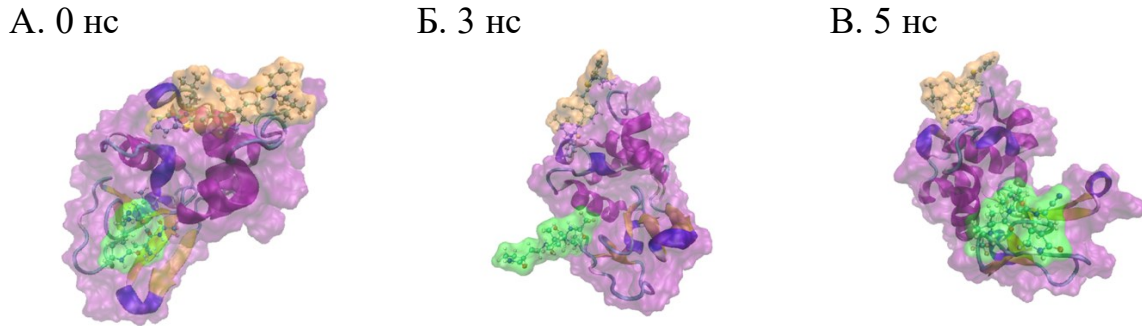


Рис 3.17 Часова еволюція системи лізоцим + нїрматрелвір + АК7-5

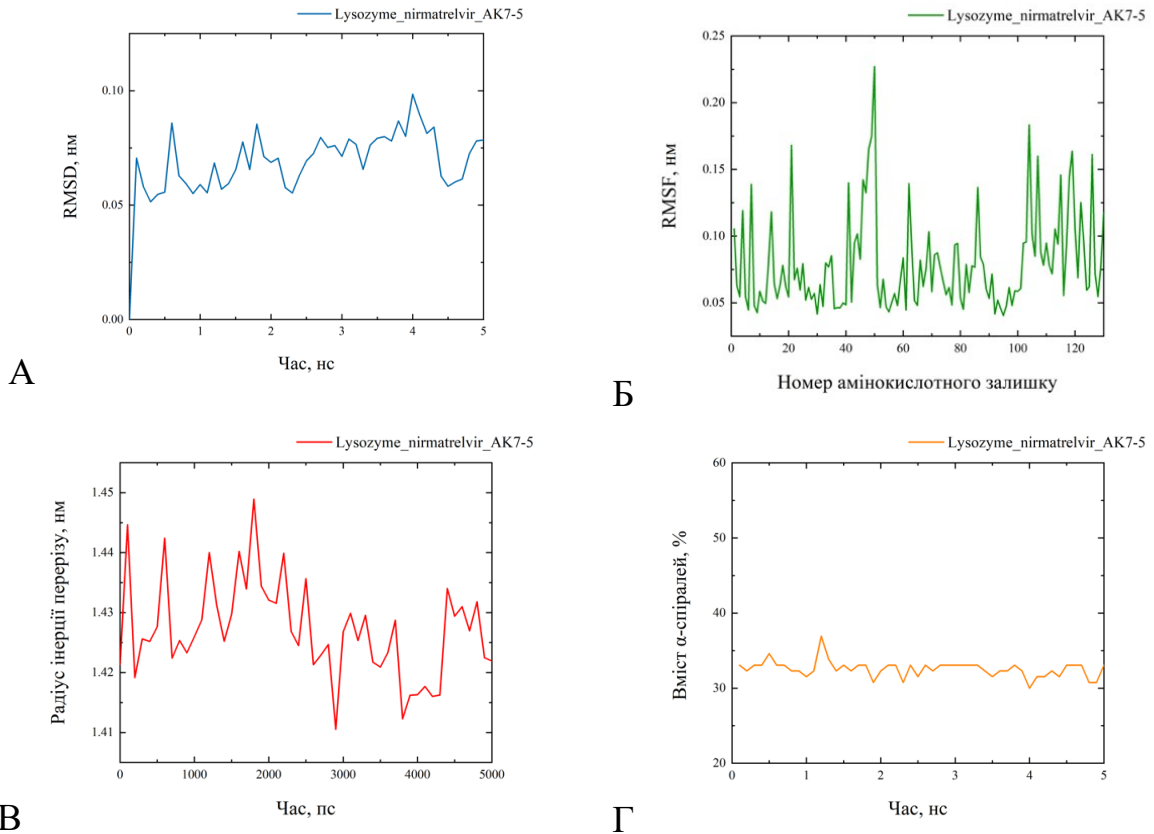


Рис. 3.18 Залежність RMSD (А), Rg (В) та вмісту альфа-спіралей у структурі білка (Г) від часу, RMSF (Б) від номеру амінокислотного залишку

RMSD даної системи змінювалось у межах від 0,075 до 0,15 нм, з тенденцією до поступового збільшення з часом. Rg досягає 1,47 нс, з трендом на поступове збільшення. Для систем з лізоцимом такі значення є одними з найвищих. Це означає, що білок змінює свою конформацію сильніше при взаємодії з молнупіравіром та АК3-11.

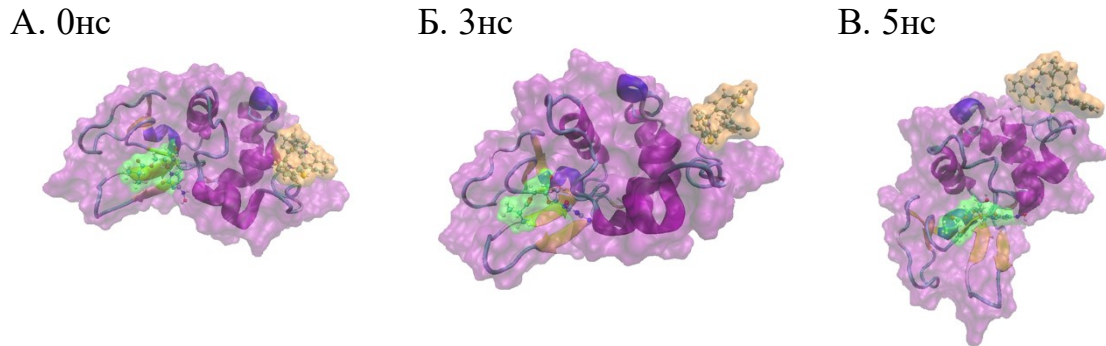


Рис 3.21 Часова еволюція системи лізоцим + молнупіравір + АК5-6

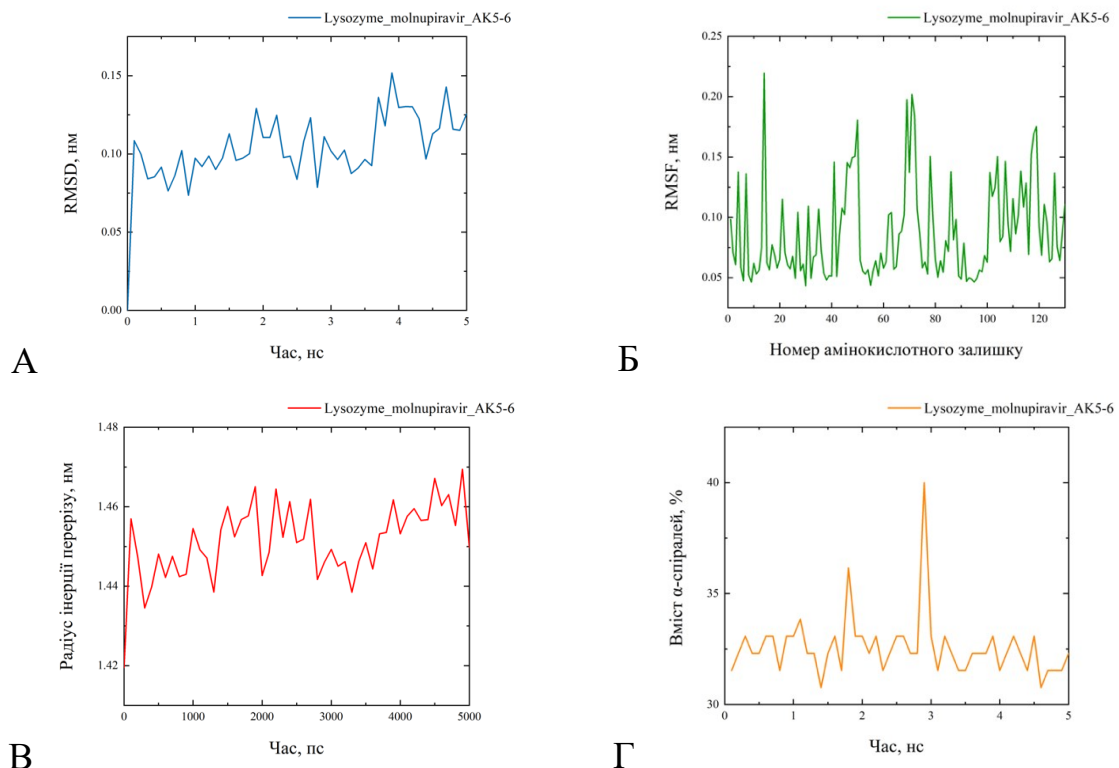


Рис. 3.22 Залежність RMSD (А), Rg (В) та вмісту альфа-спіралей у структурі білка (Г) від часу, RMSF (Б) від номеру амінокислотного залишку

Як можна побачити зміна молекули барвника не вплинула на загальну поведінку системи. Значення RMSD поступово збільшується до 0,15нм під

кінець симуляції. Однак, вторинна структура в цій системі була менш стабільною. Вміст альфа-спіралей в момент часу 1,9 нс досяг 37%, в 2,9 нс – 40%.

А. 0 нс

Б. 3 нс

В. 5 нс

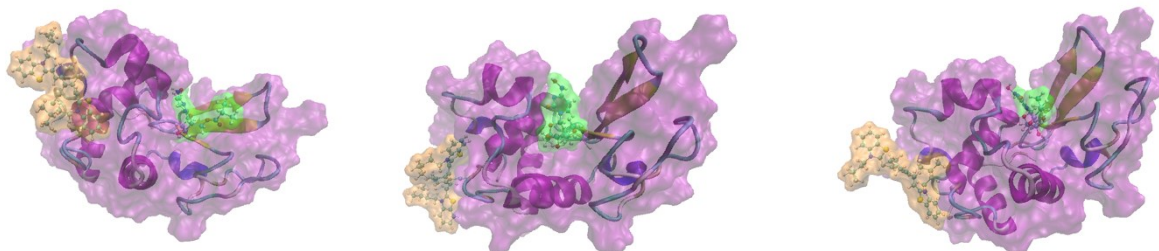


Рис 3.23 Часова еволюція системи лізоцим + молнупіравір + АК7-5

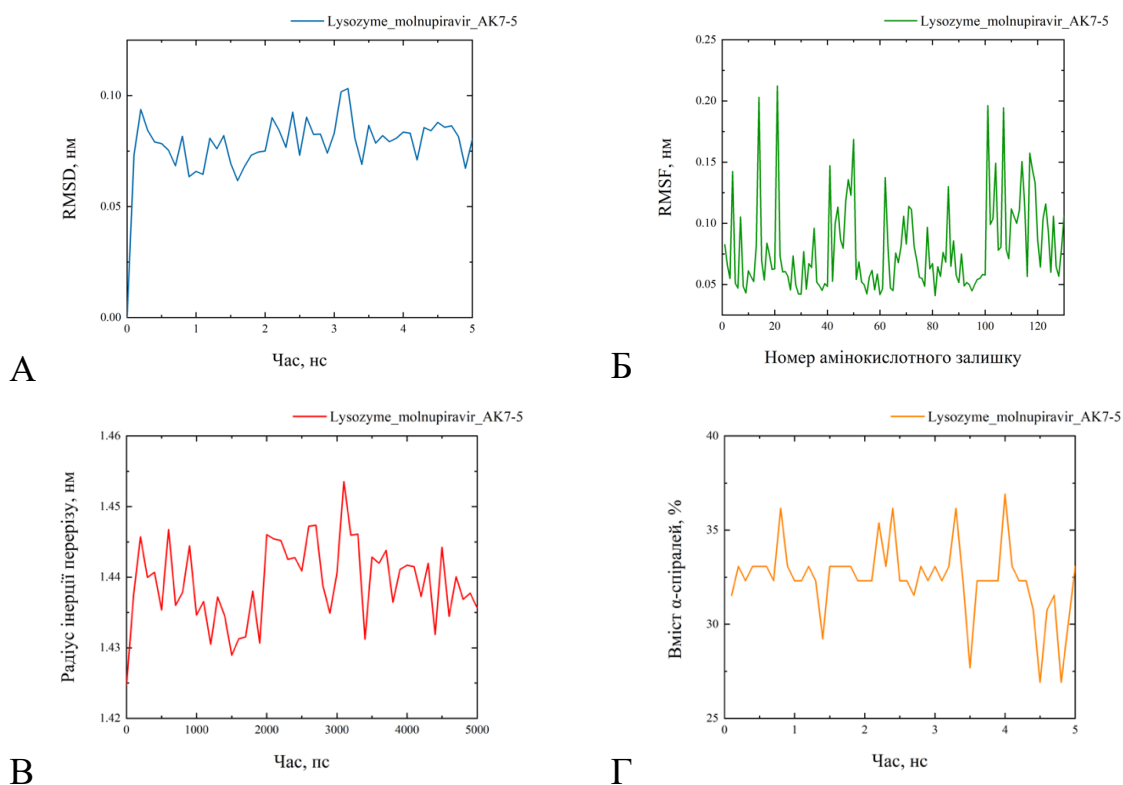


Рис. 3.24 Залежність RMSD (А), Rg (В) та вмісту альфа-спіралей у структурі білка (Г) від часу, RMSF (Б) від номеру амінокислотного залишку

Остання з розглянутих систем з молнупіравіром проявила помітно вищу стабільність. Ліганди особливо не змінювали свого положення відносно білка, а значення RMSD та Rg не перевищували 0,1 нм та 1,455 нм відповідно. Тобто білок змінював свою конформацію менше, в порівнянні з попередніми

системами. Також виділяється низьке значення відсотку альфа-спіралей: воно коливалось у межах від 27% до 37%.

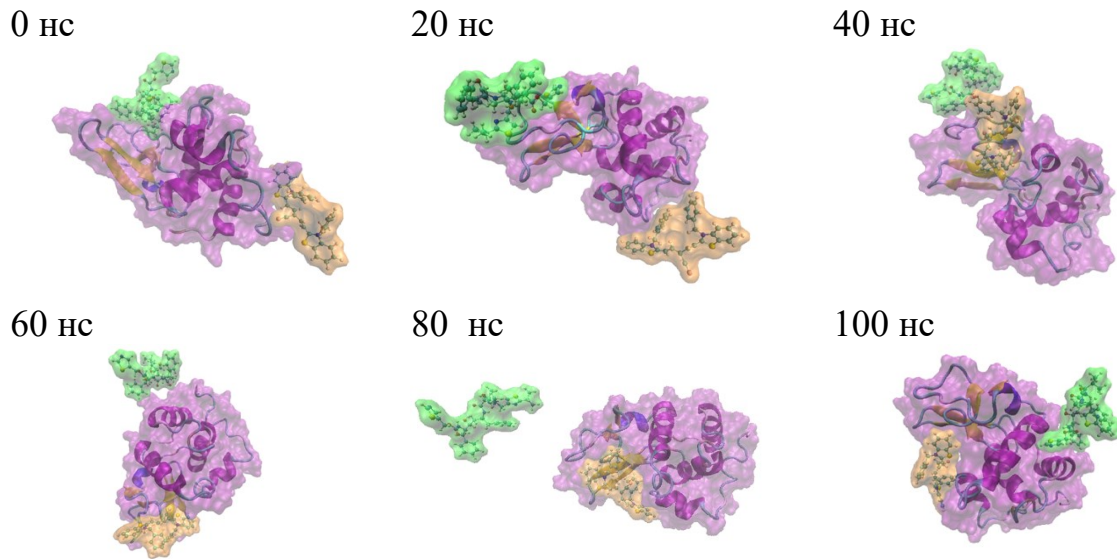


Рис. 3.25 Часова еволюція системи лізоцим + ритонавір + АК5-6

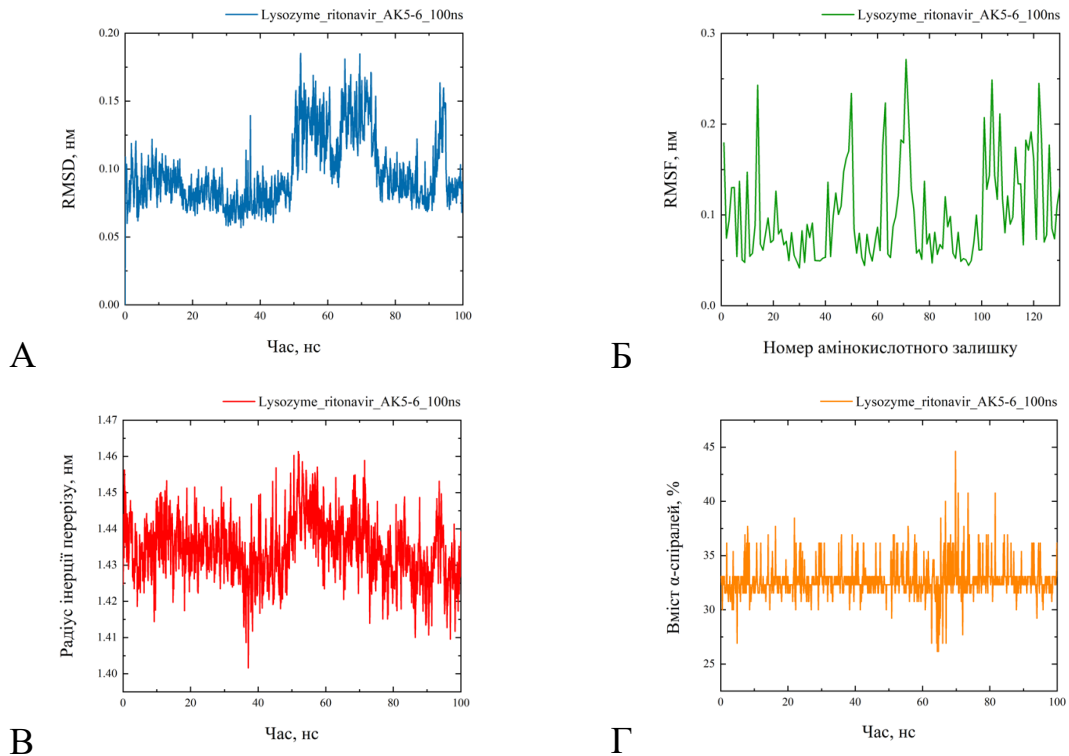


Рис. 3.26 Залежність RMSD (А), Rg (В) та вмісту альфа-спіралей у структурі білка (Г) від часу, RMSF (Б) від номеру амінокислотного залишку

Розглянемо систему з часом симуляції 100 нс. На рис. 3.25 помітно, що молекула лікарського засобу – ритонавіру – в момент часу 80 нс знаходилась на значній відстані від білка, тобто комплекс втратив стабільність. Однак в момент часу 100 нс лікарський препарат знову знаходиться в контакті з поверхнею білка. Також, на відрізку часу від 50 до 75 нс спостерігається збільшення значень RMSD та Rg. Це вказує на те, що під час відриву молекули лікарського засобу, конформація білка була більш розгорнутою та відрізнялась від початкової більш суттєво. Також в той самий час спостерігається пік у значенні вмісту альфа-спіралей протягом всього часу моделювання. Взаємодія білка з барвником була стабільною. Барвник залишався біля поверхні білка протягом всіх 100 нс.

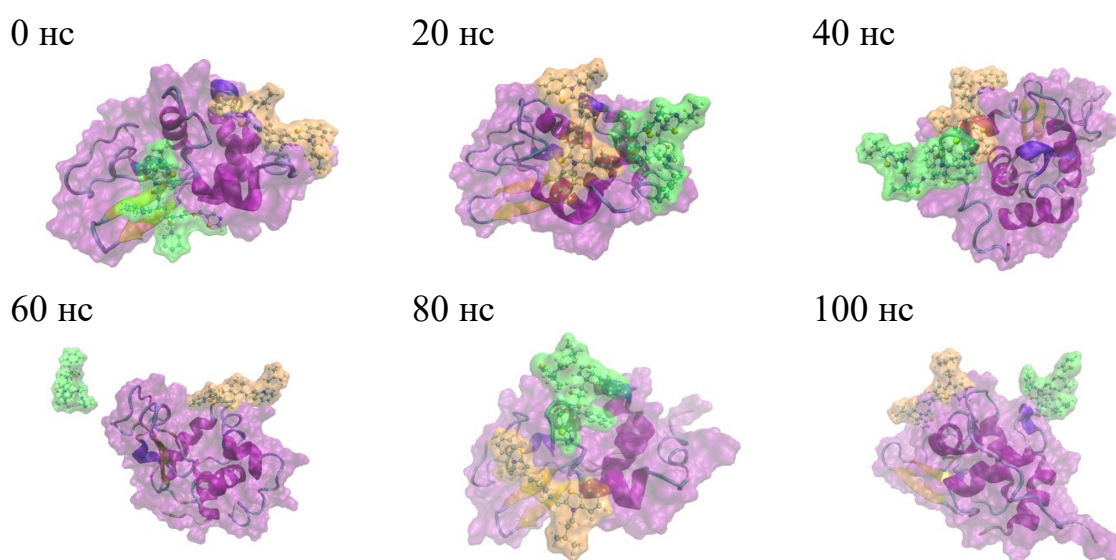


Рис. 3.27 Часова еволюція системи лізоцим + ритонавір + АК7-5

У процесі взаємодії лізоциму та ритонавіру з альтернативним барвником, молекула лікарського засобу також тимчасово відокремлюється від білкової молекули. Ритонавір перебуває у водному розчині в момент часу 60 наносекунд, але пізніше молекула відновлює взаємодію з комплексом. Стабільність цього комплексу та здатність фармацевтичного агента до тривалої взаємодії з комплексом є важливими показниками, оскільки білки можуть виконувати роль транспортних систем для доставки лікарських засобів

у кровообіг або на слизові оболонки. Стабільність системи свідчить про те, що фармацевтичний препарат зможе швидше досягти своєї цільової точки.

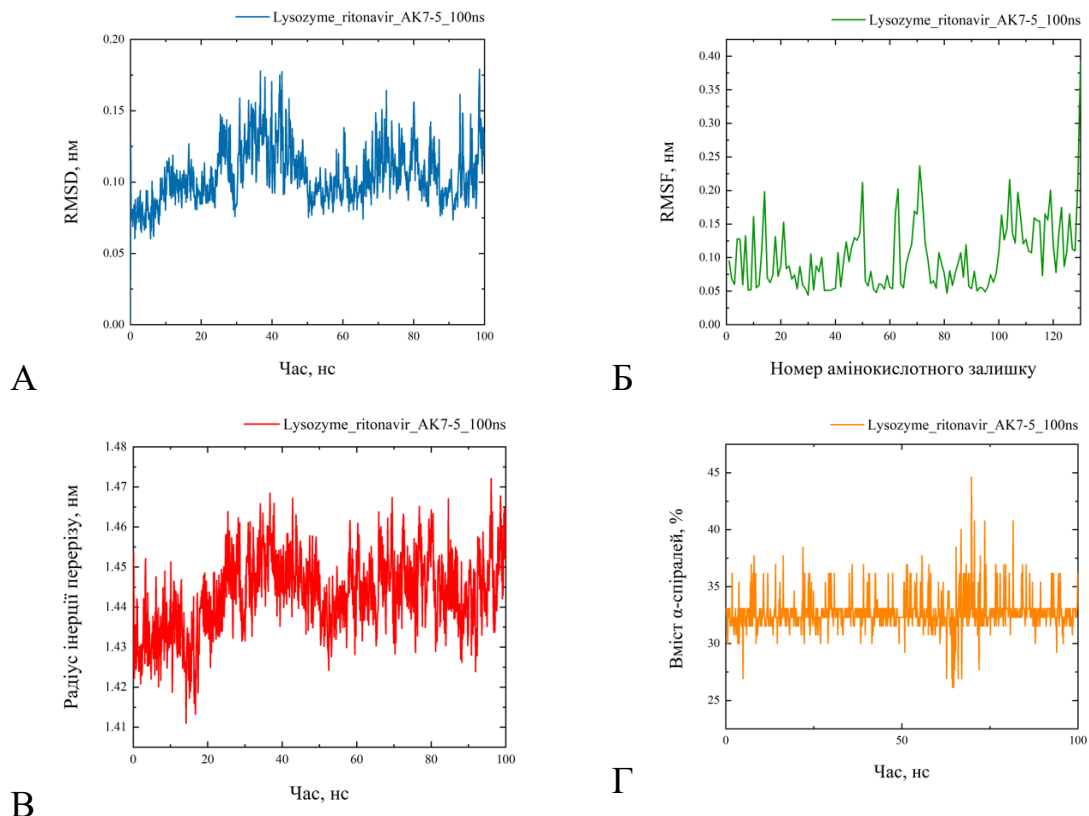


Рис. 3.28 Залежність RMSD (А), Rg (В) та вмісту альфа-спіралей у структурі білка (Г) від часу, RMSF (Б) від номеру амінокислотного залишку

Значення RMSD в білку коливалося від низького (0,05 нм) на початку симуляції до помірно високого (0,18 нм) на невеликій проміжку часу. Схожа форма графіків RMSD та Rg свідчить про те, що зміна конформації білка була пов'язана з тим, що його структура ставала менш компактною з часом. Відсотковий вміст альфа-спіралей у вторинній структурі білка повторює той самий шаблон, що і в попередній системі: спостерігаються незначні флуктуації кількості альфа-спіралей протягом всього часу, за виключенням збільшення їх вмісту в момент відриву молекули лікарського препарату від молекули білка, та поступова стабілізація значень до нормального в межах 30-35% після того, як лікарський препарат знову приєднався до комплексу.

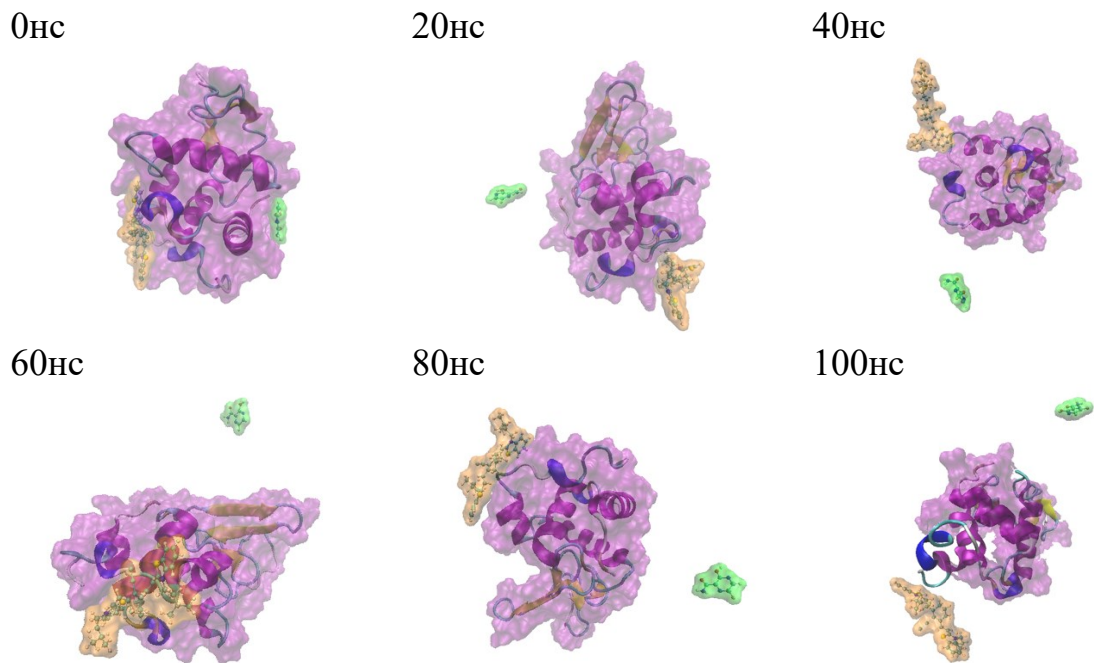


Рис. 3.29 Часова еволюція системи лізоцим + фавіпіравір + АК7-5

Ця система не була відібрана до аналізу серед систем з часом моделювання на 5нс, проте для неї було проведене моделювання на 100нс, щоб зрозуміти її подальшу взаємодію з часом. На рис. 3.29 молекула фавіпіравіру не взаємодіє з поверхнею лізоциму протягом всього часу динаміки системи. На відміну від ритонавіру, фавіпіравір не відновив взаємодію з білком, а продовжив перебувати у водному розчині. Можливі малій причині такої поведінки – низька афінність до білка та розмір молекули. В кінці симуляції комплекс остаточно втратив свою стабільність – ціаніновий барвник також відірвався від білка, чого не було виявлено в інших системах.

ВИСНОВКИ

У цій роботі за допомогою методу моделювання молекулярної динаміки було проведено дослідження стабільності комплексів функціональних білків людини (лізоциму та інсуліну) в поєднанні з противірусними препаратами (фавіпіравір, молнупіравір, нірматрелвір, ритонавір) та ціаніновими барвниками (AK3-11, AK7-5, AK5-6).

Розраховані значення середньоквадратичного відхилення (RMSD), радіусу інерції перерізу (R_g), середньоквадратичних флуктуацій C-альфа атомів (RMSF) та відсоткового складу альфа-спіралей у вторинній структурі білка дозволили визначити найбільш стабільні системи серед досліджуваних.

1. Серед 24 досліджуваних систем було відібрано 12 найбільш стабільних комплексів. Серед цих систем 4 з інсуліном та 8 з лізоцимом.
2. Значення RMSD для лізоциму знаходились у межах 0,1 – 0,15 нм, в той час як для інсуліну вони коливались від 0,1 до 0,3 нм. Ці дані, а також вдвічі вища кількість стабільних систем з лізоцимом, свідчать про те, що лізоцим є кращим кандидатом для доставки ліків в організмі.
3. Найбільша кількість стабільних комплексів – з нірматрелвіром та ритонавіром. Високу стабільність з лізоцимом продемонстрували молнупіравір та ритонавір. З інсуліном краще за все взаємодіяв нірматрелвір.
4. Фавіпіравір не утворив жодного стабільного комплексу з білками, що свідчить про його малу афінність до них.
5. За результатами аналізу RMSD, R_g , RMSF та змін вторинної структури було відібрано 6 найстабільніших комплексів: інсулін-нірматрелвір-AK7-5, лізоцим-ритонавір-AK3-11, лізоцим-ритонавір-AK5-6, лізоцим-нірматрелвір-AK7-5, лізоцим-нірматрелвір-AK3-11,

лізоцим-молнупіравір-AK7-5. Значення RMSD в цих системах були найнижчими та коливались у межах 0,05 – 0,12 нм.

6. Всі ціанінові барвники утворювали стабільні комплекси з білками, що підтверджує доцільність їх використання у якості візуалізуючого агента при використанні білків як засобів доставки ліків.

Результати роботи можуть бути використані в дослідженнях для розробки нових методів лікування вірусних інфекцій, зокрема SARS-Cov-2 та нових штамів коронавірусу. Зокрема, вони можуть допомогти в розробці нових стратегій для використання білків як засобів доставки ліків.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] На території України циркулюють 29 субваріантів COVID-19, підтипів штаму «Омікрону» [Електронний ресурс]. – 2024. – Режим доступу до ресурсу: <https://moz.gov.ua/article/news/na-teritorii-ukraini-cirkulujut-29-subvariantiv-covid-19-pidtipiv-shtamu-omikronu>.
- [2] Hogan, A.B., Doohan, P., Wu, S.L. et al. Estimating long-term vaccine effectiveness against SARS-CoV-2 variants: a model-based approach. *Nat Commun* 14, 4325 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39736-3>
<https://rdcu.be/dBqjF>
- [3] Hankiewicz J., Swierczek E., Lysozyme in human body fluids, *Clinica Chimica Acta*, Volume 57, Issue 3, 1974, Pages 205–209, ISSN 0009–8981, [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(74\)90398-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(74)90398-2).
- [4] Ragland SA, Criss AK (2017) From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog* 13(9): e1006512. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006512>
- [5] J. Mann, T. Ndungu, The potential of lactoferrin, ovotransferrin and lysozyme as antiviral and immune-modulating agents in COVID-19, *Future Virol.* 10 (2020) 609–624, <https://doi.org/10.2217/fvl-2020-0170>.
- [6] Gálvez, Alma & Plascencia-Jatomea, Maribel & Bautista-Baños, Silvia. (2020). Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology.* 38. 10.18781/R.MEX.FIT.2005–6.
- [7] Chipman DM, Sharon N. Mechanism of lysozyme action. *Science.* 1969 Aug 1;165(3892):454–65. doi: 10.1126/science.165.3892.454. PMID: 4893486.
- [8] Vanderkelen, L.; Van Herreweghe, J.M.; Michiels, C.W. Lysozyme Inhibitors as Tools for Lysozyme Profiling: Identification and Antibacterial Function of Lysozymes in the Hemolymph of the Blue Mussel. *Molecules* 2023, 28, 7071. <https://doi.org/10.3390/molecules28207071>

- [9] Ferraboschi, P.; Ciceri, S.; Grisenti, P. Applications of Lysozyme, an Innate Immune Defense Factor, as an Alternative Antibiotic. *Antibiotics* 2021, 10, 1534. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121534>
- [10] Csajbok, E.A.; Tamas, G. Cerebral cortex: A target and source of insulin? *Diabetologia* 2016, 59, 1609–1615.
- [11] Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. [Updated 2014 Feb 1]. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279029/>
- [12] Toots M, Yoon JJ, Cox RM, Hart M, Sticher ZM, Makhsous N, Plesker R, Barrena AH, Reddy PG, Mitchell DG, Shean RC, Bluemling GR, Kolykhalov AA, Greninger AL, Natchus MG, Painter GR, Plemper RK. Characterization of orally efficacious influenza drug with high resistance barrier in ferrets and human airway epithelia. *Sci Transl Med.* 2019 Oct 23
- [13] National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 197020, N(4)-Hydroxycytidine. Retrieved April 22, 2024 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N_4_-Hydroxycytidine.
- [14] Zarenezhad E, Marzi M. Review on molnupiravir as a promising oral drug for the treatment of COVID-19. *Med Chem Res.* 2022;31(2):232-243. doi:10.1007/s00044-021-02841-3
- [15] Madelain V, Nguyen TH, Olivo A, de Lamballerie X, Guedj J, Taburet AM, Mentre F: Ebola Virus Infection: Review of the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drugs Considered for Testing in Human Efficacy Trials. *Clin Pharmacokinet.* 2016 Aug;55(8):907-23. doi: 10.1007/s40262-015-0364-1.
- [16] Zhao, L., & Zhong, W. (2021). Mechanism of action of favipiravir against SARS-CoV-2: Mutagenesis or chain termination? *The Innovation*, 2(4). <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100165>

- [17] Shannon, A., Selisko, B., Le, T., Huchting, J., Touret, F., Piorkowski, G., Fattorini, V., Ferron, F., Decroly, E., Meier, C., Coutard, B., Peersen, O., & Canard, B. (2020). Rapid incorporation of Favipiravir by the fast and permissive viral RNA polymerase complex results in SARS-CoV-2 lethal mutagenesis. *Nature Communications*, *11*. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18463-z>
- [18] Naydenova, K., Muir, K. W., Wu, F., Zhang, Z., Coscia, F., Peet, M. J., Castro-Hartmann, P., Qian, P., Sader, K., Dent, K., Kimanius, D., Sutherland, J. D., Löwe, J., Barford, D., & Russo, C. J. (2021). Structure of the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase in the presence of favipiravir-RTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.2021946118>
- [19] <https://paxlovid.pfizerpro.com/why-paxlovid/mechanism-of-action>
- [20] Hu, Q., Xiong, Y., Zhu, H., Zhang, N., Zhang, W., Huang, P., & Ge, B. (2022). The SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19. *MedComm*, *3*(3). <https://doi.org/10.1002/mco2.151>
- [21] Hashemian, S. M. R., Sheida, A., Taghizadieh, M., Memar, M. Y., Hamblin, M. R., Bannazadeh Baghi, H., Sadri Nahand, J., Asemi, Z., & Mirzaei, H. (2023). Paxlovid (Nirmatrelvir/Ritonavir): A new approach to Covid-19 therapy? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *162*, 114367. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114367>
- [22] Eng, Heather, et al. "Disposition of nirmatrelvir, an orally bioavailable inhibitor of SARS-CoV-2 3C-like protease, across animals and humans." *Drug Metabolism and Disposition* *50.5* (2022): 576-590.
- [23] Chen, W., Liang, B., Wu, X., Li, L., Wang, C., & Xing, D. (2023). Advances and challenges in using nirmatrelvir and its derivatives against SARS-CoV-2 infection. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *13*(3), 255-261. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2022.10.005>
- [24] Verlet, L. (1967). Computer 'Experiments' on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review*, *159*(1), 98-103. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.159.98>

- [25] R. Zhou, "Tracing the evolution of computational approaches for structure-based drug design", SpringerBriefs in Biochemistry and Molecular Biology, Springer, 2012.
- [26] Hess B., Kutzner C., van der Spoel D., Lindahl E.; "GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation"; doi:10.1021/ct700301q
- [27] MacKerell AD, Bashford D, Bellott M, et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B*. 1998;102(18):3586-3616. doi:10.1021/jp973084f
- [28] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 1996;14(1):33-28. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5
- [29] Yarmoluk, Sergiy & Kovalska, Vladyslava & Volkova, Kateryna. (2011). Optimized Dyes for Protein and Nucleic Acid Detection. 10.1007/978-3-642-18035-4_5.
- [30] Ziarani, G. M., & Kruger, H. G. (2018). Cyanine Dyes. In *Metal-Free Synthetic Organic Dyes*. Elsevier.
- [31] Berman, Helen & Westbrook, John & Feng, Z & Gilliland, Gary & Bhat, Talapady & Weissig, Helge & Shindyalov, I.N. & Zhuang, Pelion. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*. 28. 235-42.
- [32] Hanwell, Marcus & Curtis, Donald & Lonie, David & Vandermeersch, Tim & Zurek, Eva & Hutchison, Geoffrey. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Chem Inf 4. Journal of cheminformatics*. 4. 17. 10.1186/1758-2946-4-17.
- [33] Jo, Sunhwan & Kim, Taehoon & Iyer, Vidyashankara & Im, Wonpil. (2008). CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of computational chemistry*. 29. 1859-65. 10.1002/jcc.20945.
- [34] Kufareva I, Abagyan R. Methods of protein structure comparison. *Methods Mol Biol*. 2012;857:231-57. doi: 10.1007/978-1-61779-588-6_10. PMID: 22323224; PMCID: PMC4321859.

- [35] Sneha, P., & George Priya Doss, C. (2016). Molecular Dynamics: New Frontier in Personalized Medicine. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 102, pp. 181-224). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.09.004>
- [36] T. Wu et al. *Food Chemistry* 2019, 274, 698–709