

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Холина Екатерина Георгиевна

**Молекулярные механизмы взаимодействия катионных
антимикробных соединений с мембранными структурами
бактерий и вирусов**

03.01.02 - Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва — 2021

Работа выполнена на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научные руководители

- *Страховская Марина Глебовна, доктор биологических наук*
Коваленко Илья Борисович, доктор физико-математических наук

Официальные оппоненты

- *Хренова Мария Григорьевна, доктор физико-математических наук, кафедра физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор*
Исмаилов Анвар Джураевич, доктор биологических наук, лаборатория физиологии и биохимии микробов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник
Кузнецов Андрей Сергеевич, кандидат физико-математических наук, Федеральное государственное учреждение «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, лаборатория моделирования биомолекулярных систем, научный сотрудник

Защита состоится «7» декабря 2021 г. в 16:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.02 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, дом 1, стр. 24, аудитория «Новая»

E-mail: maristra@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д.27). С информацией о регистрации участия в защите и с диссертацией в электронном виде можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/403302278/>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



М.Г. Страховская

Общая характеристика работы

Актуальность работы

В борьбе с возбудителями инфекционных заболеваний важное место занимают дезинфицирующие средства, которые широко применяются для обеззараживания различных предметов, инструментов, кожи и слизистых. Среди дезинфектантов и антисептиков значительную группу составляют вещества, молекулы которых несут положительный заряд. Хорошо известные антисептики мирамистин и хлоргексидин относятся к четвертичным аммониевым соединениям и бигуанидам, соответственно [Gilbert, 2005; Osmanov, 2019].

Связывание с отрицательно заряженной поверхностью клеток бактерий определяет избирательность действия катионных биоцидов, поскольку плазматические мембраны животных клеток состоят преимущественно из цвиттерионных фосфолипидов и при физиологических значениях pH заряжены нейтрально [Erland, 2009]. В то же время, высокая концентрация отрицательно заряженных структур может удерживать положительно заряженные молекулы на поверхности бактериальных клеток. Так, по предположению ряда авторов, липополисахариды наружной мембраны грамотрицательных бактерий могут создавать непреодолимый барьер на пути проникновения катионных биоцидов внутрь бактериальной клетки [Nikaido, 2001]. Катионные антисептики с молекулярной массой до 600 Да проникают через наружную мембрану грамотрицательных бактерий, используя пориновые каналы, и оказывают деструктивное действие преимущественно на плазматическую мембрану бактериальной клетки [McDonnell, 1999].

Широкое применение биоцидов в не всегда оптимальных концентрациях приводит к прогрессирующему росту резистентных патогенов. Устойчивость бактерий к действию катионных антисептиков достигается, главным образом, за счет экспрессии выкачивающих белков-помп, что может приводить к выработке перекрестной резистентности между антисептиками и антибиотиками. Другой менее изученной группой адаптационных механизмов бактерий к катионным антисептикам является модификация структур клеточной стенки, включая пептидогликан и наружную мембрану у грамотрицательных бактерий [Joo, 2016; Jones, 2021].

Для борьбы с патогенами, устойчивыми к традиционным антимикробным препаратам, предлагают применять фотодинамическую инактивацию, в которой используются фотосенсибилизаторы – фотоактивируемые биоциды. Наиболее эффективными фотосенсибилизаторами в отношении широкого круга бактерий являются катионные производные порфиринов, фталоцианинов и других красителей [Hamblin, 2004; Strakhovskaya, 2009]. Как правило, фотосенсибилизаторы обладают гораздо большей молекулярной массой, чем антисептики, и, в отличие от последних, не могут проникать через наружную липополисахаридную мембрану с помощью

пориновых каналов. Такие фотосенсибилизаторы связываются с отрицательно заряженной клеточной стенкой бактерий и в фотовозбужденном состоянии генерируют активные формы кислорода, оказывающие деструктивное действие на мембранные структуры [Almeida, 2015]. Пробег синглетного кислорода (основного цитотоксического агента при фотодинамической инактивации) сравним с толщиной клеточной стенки грамотрицательных бактерий [Agostinis, 2011]. Остается непонятным, какая фракция молекул фотосенсибилизатора ответственна за наблюдаемое в экспериментах окислительное повреждение плазматической мембраны, достаточна ли локализация молекул фотосенсибилизатора на поверхности клетки или необходим их перенос через наружную мембрану, и через какие участки наружной мембраны такой перенос может быть реализован.

Помимо бактерицидного действия, катионные фотосенсибилизаторы высоко эффективны в отношении оболочечных вирусов [Korneev, 2019; Kuznetsova, 2009], мембраны которых происходят из мембран эукариотной клетки-хозяина и содержат преимущественно цвиттерионные фосфолипиды. Это отличает фотосенсибилизаторы от мембрано-активных катионных антисептиков, имеющих ожидаемо слабую вирулицидную активность. Вопрос о природе сайтов связывания катионных фотосенсибилизаторов со структурами оболочек вирусов остается открытым. Это особенно актуально в свете последних исследований нашей лаборатории с ФИЦ ФТМ (Новосибирск), в которых показана возможность полного фотодинамического обеззараживания водной среды от коронавируса SARS-CoV-2 с использованием октакатионного производного фталоцианина цинка [Sharshov, 2021].

Изучение взаимодействия молекул биоцидов с компонентами оболочек бактерий и вирусов на молекулярном уровне является сложной задачей, которая тем не менее может быть решена методами компьютерного моделирования, позволяющими детально охарактеризовать всю картину межмолекулярных взаимодействий и показавшими высокую эффективность при исследовании механизмов биологических процессов.

Цели и задачи

Целью работы является изучение межмолекулярных взаимодействий при связывании катионных биоцидов, применяемых в качестве антисептиков и фотосенсибилизаторов, с компонентами оболочек бактерий и вирусов и переносе их через мембранные структуры микроорганизмов методами молекулярного моделирования.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. С помощью крупнозернистого молекулярного моделирования изучить влияние антигенных цепей на взаимодействие катионных антисептиков с бактериальными мембранами, имитирующими наружные липополисахаридные мембраны различного состава.

2. Изучить взаимодействие катионных антисептиков с фосфолипидными бислоями, имитирующими различные области бактериальной плазматической мембраны, в том числе обогащенные кардиолипином участки на полюсах бактериальной клетки.
3. Изучить взаимодействие катионных фотосенсибилизаторов со структурами оболочки коронавирусов.

Объект и предмет исследования

Объектами исследования являются молекулярные модели антимикробных веществ группы антисептиков и фотосенсибилизаторов, бактериальные мембраны и S-белки коронавирусов. Предметом исследования являются межмолекулярные взаимодействия фотосенсибилизаторов и антисептиков с компонентами оболочек бактерий и вирусов.

Научная новизна и практическая значимость работы

В настоящее время молекулярное моделирование показало себя мощным инструментом для изучения межмолекулярных взаимодействий. В нашей работе этот подход позволил охарактеризовать в микросекундном диапазоне этапы процессов связывания биоцидов с микробными мишенями, оценить их характерные времена и описать динамику переноса данных агентов через мембранные барьеры.

С помощью созданных крупнозернистых моделей катионных антисептиков построена детальная картина взаимодействий молекул бигуанидов и четвертичных аммониевых соединений с бактериальными мембранами различного состава. Показана защитная роль антигенных цепей липополисахаридов на пути проникновения биоцидов внутрь бактериальных клеток. Показано, что встраивание катионных антисептиков в модельную плазматическую мембрану приводит к нарушению структуры и функциональных свойств бислоя.

Методами крупнозернистой молекулярной динамики раскрыт механизм самоиндуцированного проникновения катионных фотосенсибилизаторов, производных металлофталоцианинов, через липополисахаридную мембрану, возможность которого высказывалась ранее в литературе.

Методами броуновской динамики на поверхности спайковых белков коронавирусов человека выявлены области отрицательного электростатического потенциала, способные связывать катионные фотосенсибилизаторы, что объясняет природу экспериментально обнаруженной вирулицидной активности.

Знание детальных молекулярных взаимодействий, лежащих в основе бактерицидных и вирулицидных свойств биоцидов, способствует их рациональному применению в медицинских целях и служит основой для успешного дизайна новых эффективных антимикробных агентов.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием компьютерного моделирования, включая проведение расчетов методами полноатомной и крупнозернистой молекулярной динамики, зонтичной выборки в рамках неравновесной молекулярной динамики, а также броуновской динамики.

Личный вклад автора заключается в создании полноатомных молекулярных моделей октакис(холинил) металлофталоцианина и катионных антисептиков, участии в создании крупнозернистых моделей катионных антисептиков и непосредственном создании крупнозернистых моделей липополисахаридов с О-антигенными цепями и полирамнозным антигеном. Также вклад автора состоит в проведении и анализе молекулярно-динамических расчетов, анализе расчетов броуновской динамики, интерпретации результатов, подготовке публикаций и докладов по теме диссертации.

Положения, выносимые на защиту

1. С помощью построенных крупнозернистых моделей методами молекулярной динамики раскрыта детальная молекулярная картина взаимодействий катионных антисептиков с кардиолипидной мембраной, приводящих к «вырыванию» липидов из бислоя.
2. Отрицательно заряженные и нейтральные антигенные цепи липополисахаридов создают барьерный слой, связывая молекулы катионных антисептиков.
3. Электростатические взаимодействия играют определяющую роль в действии фотосенсибилизатора октакис(холинил)фталоцианина цинка на монослой асимметричной мембраны, содержащий отрицательно заряженные липополисахариды. Раскрыта активная роль молекул фотосенсибилизатора в формировании поры, обеспечивающей его самооблегченный транспорт.
4. Основным общим для коронавирусов человека центром связывания катионных фотосенсибилизаторов является область отрицательного потенциала на S2 субъединице спайкового белка.

Апробация работы

Материалы работы были представлены на семинарах сектора информатики и биофизики сложных систем и следующих российских и международных конференциях: международной конференции “Биомембраны”, Долгопрудный, Россия, 2018; международных конференциях “Математика. Компьютер. Образование”, Пущино, Россия, 2017, 2019, 2021; Дубна, Россия, 2018, 2020; VI Съезд биофизиков России, Сочи, Россия, 2019; международной конференции “Математическое моделирование в биологии” Российский университет дружбы народов, Москва, Россия, 2019 г.; Всероссийской конференции “Актуальные проблемы биомедицины-2021”, Санкт-Петербург, Россия, 2021; международной конференции “Экспериментальная и компьютерная биомедицина”, Екатеринбург, Россия, 2021;

международной конференции “The 20th FEBS Young Scientists’ Forum (YSF)”, Ловран, Хорватия, 2021;

Публикации

По материалам работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах и сборниках, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RCSI, а также статья в рецензируемом журнале из списка ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературных источников, состоящий из 214 наименований. Работа содержит 37 рисунков и 17 таблиц.

Основное содержание работы

Введение

Во введении обосновывается актуальность темы диссертации, формулируются цели и задачи исследования, приводятся положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы

В разделе Обзор литературы описано строение бактериальных мембран, включая наружную липополисахаридную мембрану грамотрицательных бактерий и плазматическую мембрану грамотрицательных и грамположительных бактерий. Рассмотрено разнообразие модификаций структуры липополисахаридов. Особое внимание уделено прогрессу в моделировании липополисахаридных мембран. Описано строение и функциональное значение молекулярных компонентов оболочки коронавирусов. Рассмотрены современные представления о фотодинамической инактивации микроорганизмов, включая описание основных групп фотосенсибилизаторов. Описаны современные представления о катионных антисептиках группы бигуанидов и четвертичных аммониевых соединений.

Методология и методы исследования

В работе использован крупнозернистый подход к созданию молекулярных моделей антимикробных соединений и компонентов оболочек бактерий и вирусов, в котором вместо атомов рассматриваются частицы, представляющие собой объединенные группы атомов, что позволяет исследовать эволюцию молекулярной системы на временах порядка десятков микросекунд.

Топологии для полноатомных моделей антимикробных соединений были получены с использованием онлайн сервиса Automated Topology Builder (ATB) на основе оптимизированных с помощью квантово-химических расчетов структур. Крупнозернистые модели антимикробных веществ и липополисахаридов были созданы в рамках силового поля Martini. Все молекулярно-динамические расчеты были проведены с использованием программного пакета Gromacs. Характеристики модельных бислоев в присутствии антимикробных соединений были вычислены с использованием встроенных утилит программного пакета Gromacs и с помощью программ, написанных на языке Python, с применением функций библиотеки MDAnalysis.

Для оценки потенциальных областей связывания фотосенсибилизаторов с S-белками коронавируса был применен метод броуновской динамики, в котором молекулы рассматриваются как твердые тела, для которых характерно поступательное и вращательное движение. Электростатические взаимодействия молекул описываются законом Пуассона-Больцмана. Для моделирования межмолекулярных взаимодействий использовали разработанное на кафедре биофизики биологического факультета МГУ программное обеспечение ProKSim (Protein Kinetics Simulator).

Результаты и обсуждение

Взаимодействие катионных антисептиков с липополисахаридными мембранами различного состава

На основе построенных полноатомных моделей созданы крупнозернистые модели катионных антисептиков группы бигуанидов (хлоргексидин, пиклоксидин) и четвертичных аммониевых соединений (мирамистин, октенидин), а также модели шероховатых и гладких липополисахаридных мембран с антигенными цепями различного состава.

На основе проведенных крупнозернистых молекулярно-динамических расчетов показано, что антисептики не проникают внутрь коровой части шероховатых мембран. Бигуаниды сорбировались на поверхности внешней коровой части в виде «ковра» (Рис. 1 А-Б), мирамистин (Рис. 1 В) – в виде мицеллярного агрегата, для октенидина сорбция молекул на бислое не наблюдалась (Рис. 1 Г). Для шероховатой мембраны, в которой отсутствовала модификация коровой части остатками фосфоэтаноламина, наблюдался такой же характер сорбции антисептиков (Рис. 1 А). Поскольку антисептики не проникали внутрь коровой части, их присутствие не влияло на такие характеристики бислоя, как площадь, приходящаяся на молекулу липополисахарида, и на толщину бислоя.

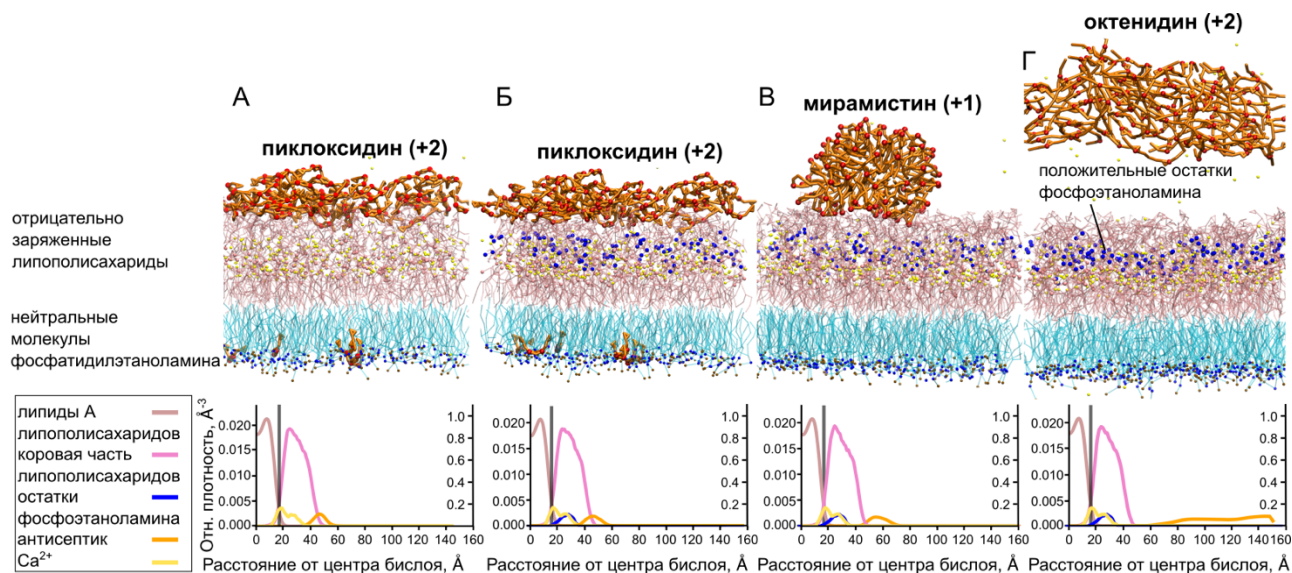


Рисунок 1. Взаимодействие антисептиков пиклоксидина (А-Б), мирамистина (В) и октенидина (Г) с шероховатыми липополисахаридными мембранами. Липополисахариды показаны розовым, липиды – голубым, молекулы антисептика – оранжевым, остатки фосфоэтаноламина – увеличенными синими сферами, ионы Ca^{2+} – желтым.

Для исследования влияния антигенных цепей на взаимодействие с антисептиками были созданы три гладких липополисахаридных мембраны, содержащих (1) 75% шероховатых и 25% гладких липополисахаридов с О-антигенами О5, (2) 75% шероховатых и 25% гладких липополисахаридов с полирамнозными антигенами и (3) 50% шероховатых и по 25% гладких липополисахаридов с обоими вариантами антигенных цепей. На созданных моделях было показано, что все катионные антисептики сорбируются на мембраны с отрицательно заряженными О-антигенными цепями О5, при этом бигуаниды распределяются по слою О-антигенов относительно равномерно (Рис. 2 А). Представители четвертичных аммониевых соединений сорбировались в виде агрегатов: мирамистин – на 11-й и 12-й терминальные повторяющиеся фрагменты О-антигенных цепей, октенидин полностью встраивался в слой О-антигенов вплоть до 3-го повторяющегося фрагмента О5 (Рис. 2 Б). Для полирамнозных антигенов была показана более сильная компактизация вдоль нормали к мембране по сравнению с О-антигенами О5. Характер сорбции катионных антисептиков на такую мембрану был аналогичен таковому для мембраны с О5 О-антигенами (Рис. 2 В), за исключением октенидина, который не проявлял сродства к полирамнозным антигенам (Рис. 2 Г).

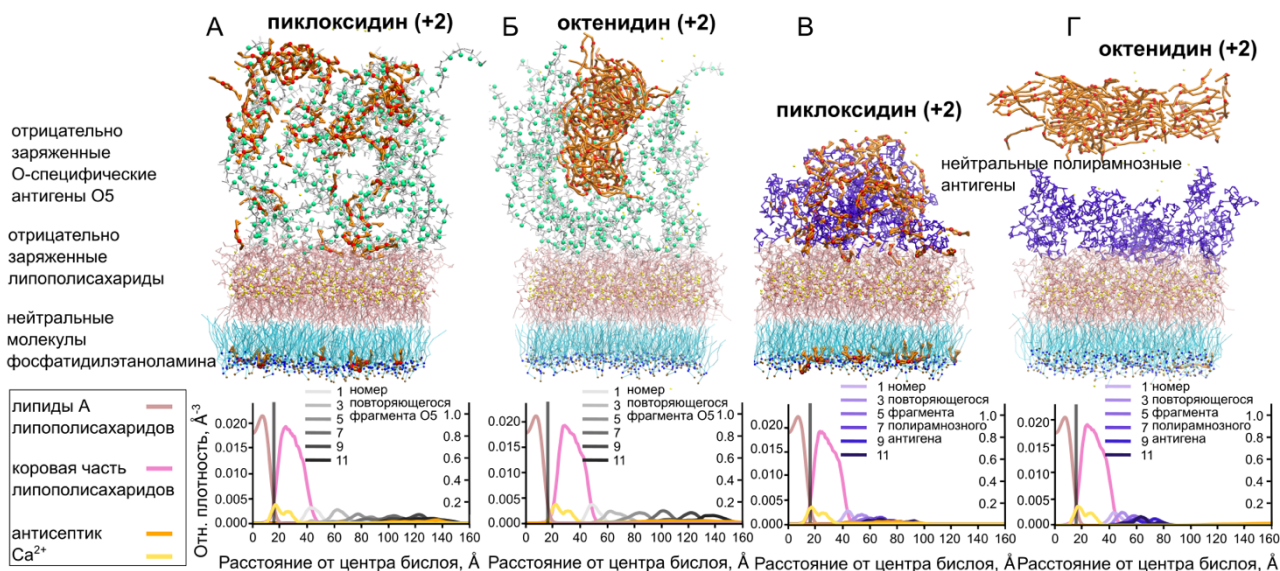


Рисунок 2. Взаимодействие антисептиков с гладкими липополисахаридными мембранами, содержащими О-специфические антигены О5 (А-Б) и полирамнозные антигены (В-Г). Липополисахариды показаны розовым, липиды – голубым, О5 – серым с зелеными отрицательно заряженными частицами, полирамнозный антиген – фиолетовым, молекулы антисептика – оранжевым, ионы Ca²⁺ – желтым.

Также было продемонстрировано, что увеличение концентрации в бислое гладких липополисахаридов до 50% приводит к вытягиванию антигенных цепей вдоль нормали к бислою. Характер взаимодействия катионных антисептиков с мембраной, содержащей оба варианта антигенных цепей, был аналогичен таковому для бислоя с О5 О-антигенами. На всех типах рассмотренных липополисахаридных мембран было продемонстрировано отсутствие деформации модельных бислоев в присутствии катионных антисептиков, что позволяет считать плазматическую бактериальную мембрану основной мишенью данной группы антимикробных веществ.

Взаимодействие катионных антисептиков с плазматической мембраной, состоящей из фосфатидилэтаноламина и фосфатидилглицерола

В качестве модели плазматической бактериальной мембраны был выбран бислой состава фосфатидилэтаноламин:фосфатидилглицерол 3:1, к которому катионные антисептики добавлялись в разных концентрациях. Во всех расчетах крупнозернистой молекулярной динамики антисептики полностью сорбировались на мембране в течение нескольких микросекунд, при этом не вызывали дезинтеграции модельной мембраны. Адсорбция антисептиков сопровождалась встраиванием их гидрофобных участков внутрь модельного бислоя, в то время как положительно заряженные группы располагались рядом с фосфатами липидов на поверхности мембраны. Встроенные в мембрану представители бигуанидов и октенидин обладали формой «скобы», молекулы мирамистина – формой «крючка», закрепленного длинным гидрофобным

хвостом внутри мембраны. Было показано, что в присутствии антисептиков снижаются коэффициенты латеральной диффузии липидов с наиболее выраженным эффектом для антисептика октенидина и наиболее слабым – для мирамистина. Все изученные антисептики незначительно влияли на среднюю толщину мембраны, за исключением октенидина, добавление которого в соотношении антисептик:липид 1:4 приводило к значительному утончению модельного бислоя. Был продемонстрирован разный характер влияния на параметры порядка жирнокислотных цепей липидов: в присутствии бигуанидов и октенидина наблюдалось снижение параметров порядка, в присутствии мирамистина – небольшое повышение.

Чтобы исследовать, могут ли катионные антисептики влиять на поведение бислоев, находящихся во внешнем электрическом поле, были проведены дополнительные молекулярно-динамические расчеты с прикладыванием электрического поля вдоль нормали к уравновешенным бислоям в присутствии антисептиков. Приложенное электрическое поле напряженностью 150 мВ/нм примерно соответствует приложенному трансмембранному потенциалу 600 мВ. Используемая напряженность электрического поля находится в экспериментально установленном диапазоне значений, при которых происходит пробой биологических мембран. В модельной мембране при таком значении приложенного потенциала время порации в присутствии антисептиков уменьшалось в 1,2-2,6 раза. Во всех случаях при приложении внешнего электрического поля молекулы воды проникали в бислой, образуя «водяной палец», с последующим формированием полной поперечной поры (Рис. 3 А). Этот процесс часто инициировался на локальных дефектах бислоя.

Анализ времени порации выявил отчетливые зависимости от концентрации для разных классов антисептиков (Рис. 3 Б). Для бигуанидов увеличение концентрации при постоянном значении внешнего поля приводило к более длительному времени порации за счет образования полужесткого каркаса этими двухзарядными частицами, связывающими липиды в протяженные участки. Для молекул мирамистина была продемонстрирована обратная тенденция: время порации слегка уменьшалось с увеличением концентрации. Таким образом, было показано, что встраивание катионных антисептиков в мембраны приводит к возникновению различных локальных неоднородностей, таких как флуктуации толщины, утончение мембраны и преимущественное взаимодействие катионных антисептиков с молекулами фосфатидилглицерола, что в конечном итоге повышает вероятность порации.

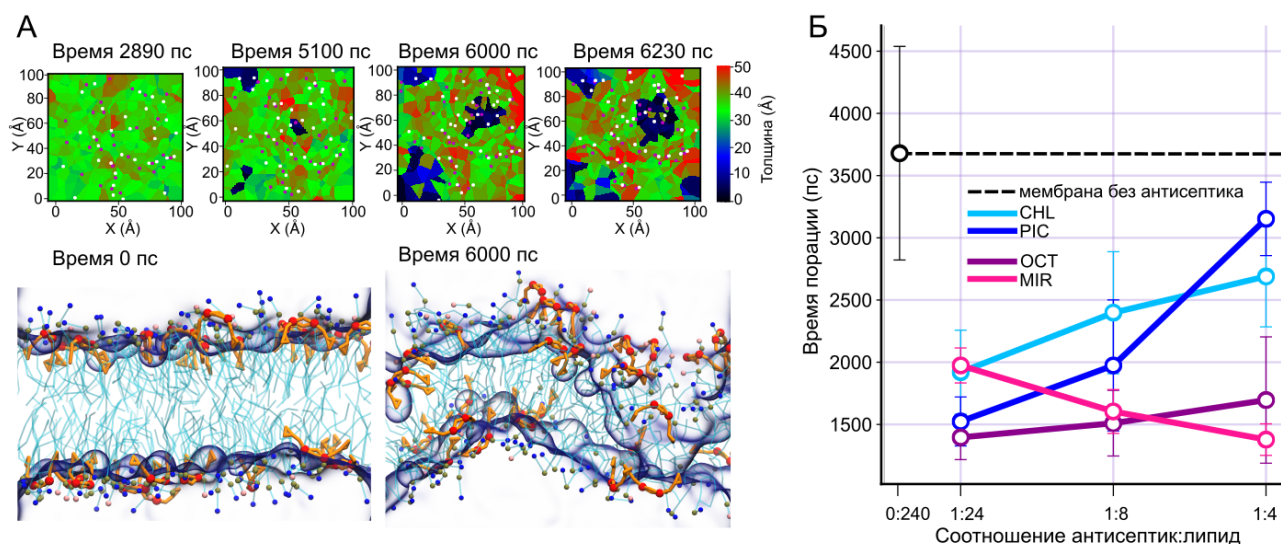


Рисунок 3. Электропорация бислоя состава фосфатидилэтаноламин: фосфатидилглицерол 3:1 в присутствии антисептиков. (А) Последовательные этапы формирования трансмембранной поры в модельном бислое в присутствии пиклоксидина под воздействием внешнего электрического поля напряженностью 150 мВ/нм. На верхней панели цветом показана локальная толщина мембраны, нижняя панель иллюстрирует изменение формы мембраны при образовании поры. Липиды показаны голубым, пиклоксидин – оранжевым. Вода и ионы показаны в виде фиолетовой полупрозрачной поверхности. (Б) Время порации модельной мембраны в отсутствии (черная линия) и в присутствии антисептиков в различных концентрациях (отражены разными цветами) при приложении электрического поля (150 мВ/нм).

Взаимодействие катионных антисептиков с плазматической мембраной, состоящей из фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерола и кардиолипина

Известно, что бактериальные плазматические мембраны содержат значительное количество отрицательно заряженных липидов, в том числе кардиолипин, для которого характерна локализация на полюсах бактериальной клетки. Такая локализация связана с особой конической формой молекул кардиолипина, приводящей к его концентрированию в областях мембраны с отрицательной кривизной. Колокализация с кардиолипином белков, участвующих в клеточном делении и осмоадаптации, определяет важнейшую роль этого липида в жизнедеятельности клетки [Mileykovskaya, 2009; Lin, 2016]. Обогащенные кардиолипином участки мембраны, очевидно, могут эффективно связывать катионные биоциды.

В качестве крупнозернистой модели кардиолипин содержащей плазматической мембраны был создан бислой состава фосфатидилэтаноламин:фосфатидилглицерол: кардиолипин 81:7:12 (по массе). Как и в случае бислоя состава фосфатидилэтаноламин:фосфатидилглицерол 3:1, в присутствии катионных

антисептиков наблюдалось снижение коэффициентов латеральной диффузии липидов, незначительное снижение толщины бислоя, увеличение площади на липид и аналогичное влияние на упаковку жирных кислот. На модельном бислое, модифицированном кардиолипином, было продемонстрировано, что октенидин в высокой концентрации способствует формированию в бислое кардиолипидного микродомена с последующей адсорбцией на него агрегата из молекул октенидина и вырыванием из бислоя нейтрального фосфоэтаноламина (Рис. 4).

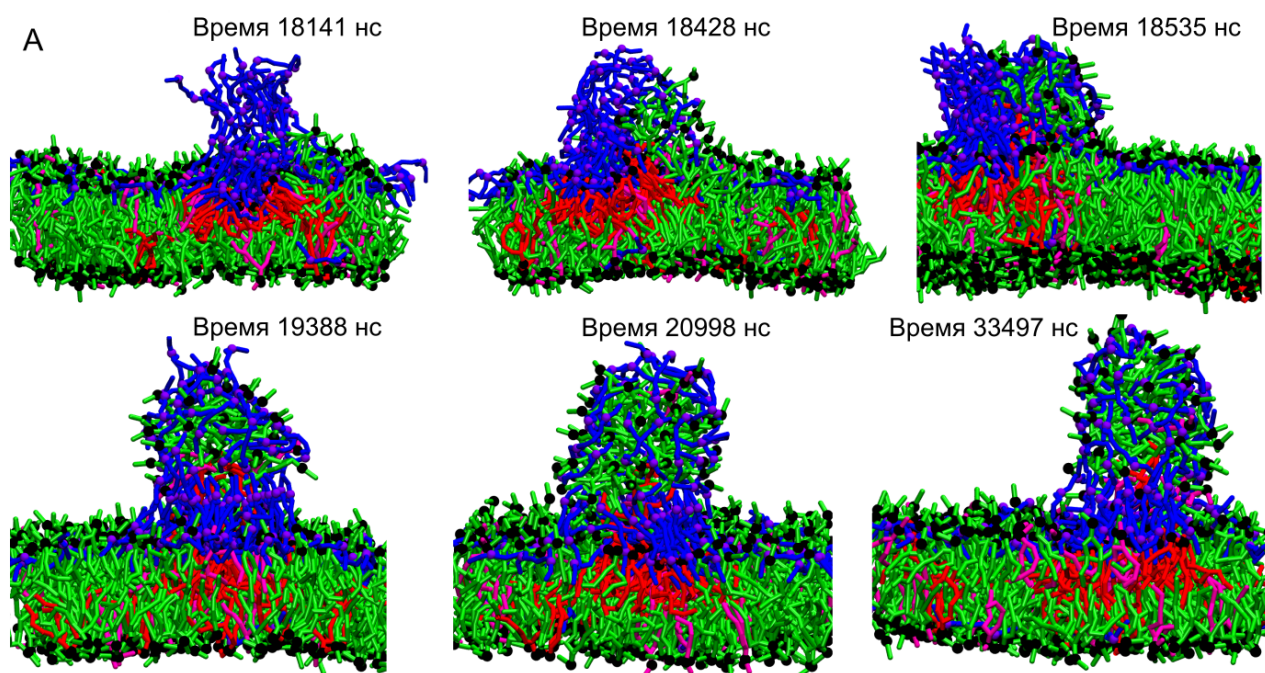


Рисунок 4. Эффект вырывания липидов молекулами октенидина в высокой концентрации из модельной плазматической бактериальной мембраны, модифицированной кардиолипином. Фосфатидилэтаноламин показан зеленым, фосфатидилглицерол – розовым, кардиолипид – красным, октенидин – синим.

Изучение взаимодействия октакис(холинил)фталоцианина цинка с модельными бактериальными мембранами

В нашей лаборатории показана высокая активность фотосенсибилизатора октакис(холинил)фталоцианина цинка (ZnPc^{8+}) в отношении грамположительных и грамотрицательных возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе антибиотикорезистентных клинических штаммов. В то же время, действующие концентрации фотосенсибилизатора могут различаться в зависимости от вида и штамма патогена в несколько раз. Одним из наиболее устойчивых к фотодинамической инактивации видов является *P. aeruginosa* – повсеместно распространенный вид грамотрицательных бактерий, способный выживать в

различных условиях окружающей среды и характеризующийся устойчивостью ко многим биоцидам [Pang, 2019]. Для адаптации к меняющимся условиям окружающей среды бактерии *P. aeruginosa* в составе клеточной стенки экспрессируют различные варианты липополисахаридов, как полные формы с О-антигенными или полирамнозными цепями, так и усеченные – без антигенных цепей. Последние характерны для клинических штаммов *P. aeruginosa*, возбудителей хронического муковисцидоза.

С помощью созданной нами ранее крупнозернистой модели ZnPc^{8+} было изучено его взаимодействие с двумя типами модельных бактериальных мембран: (1) симметричным бислоем состава фосфатидилэтаноламин:фосфатидилглицерол 3:1, имитирующим внутреннюю мембрану грамотрицательных бактерий, и (2) асимметричным бислоем, состоящим из липополисахаридов шероховатого типа во внешнем монослое и фосфатидилэтаноламина во внутреннем монослое и имитирующим наружную мембрану грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa*.

Для изучения начальных этапов связывания ZnPc^{8+} с модельными мембранами выбранного состава, были проведены равновесные молекулярно-динамические расчеты адсорбции десяти молекул ZnPc^{8+} в течение 1 мкс моделирования. В данных расчетах было показано, что молекулы ZnPc^{8+} легко адсорбировались на обоих типах бактериальных модельных мембран. В длительном (60 мкс) вычислительном эксперименте при температуре 350 К наблюдалось ступенчатое проникновение одиночной молекулы ZnPc^{8+} в коровую часть шероховатого бислоя, начиная примерно с 25 мкс от начала расчета. В двух дополнительных расчетах с заменой нейтрализующих ионов Ca^{2+} на ионы Na^+ и добавлением фосфолипидов во внешний липополисахаридный монослой было продемонстрировано ускорение проникновения ZnPc^{8+} внутрь бислоя.

Однако, несмотря на явную тенденцию ZnPc^{8+} проникать в липополисахаридный монослой, исследование этого процесса в равновесных молекулярно-динамических расчетах при комнатной температуре затруднено из-за ограниченности вычислительных ресурсов. Чтобы преодолеть это ограничение и оценить термодинамические параметры перемещения ZnPc^{8+} через модельные мембраны, был применен метод зонтичной выборки. Из профилей свободной энергии (Рис. 5 А) для системы фосфатидилэтаноламин:фосфатидилглицерол 3:1 следует, что при пересечении мембраны ZnPc^{8+} существует значительный энергетический барьер. Однако для данного бислоя на профиле свободной энергии существует небольшой энергетический минимум около 15 kT на расстоянии около 1,4 нм от центра мембраны, который соответствует процессу адсорбции, наблюдаемому в равновесных молекулярно-динамических расчетах. В отличие от фосфолипидного бислоя процесс транслокации ZnPc^{8+} внутрь липополисахаридной мембраны является энергетически выгодным. Глобальный минимум профиля свободной энергии расположен на расстоянии 0,5 нм от центра гидрофобной плоскости бислоя (Рис. 5 А), что указывает на то, что ZnPc^{8+} может спонтанно проникать в центр липополисахаридной

мембраны, что приводит к ее серьезному искажению и образованию водной поры, пронизывающей весь бислой (Рис. 5 Б-Г).

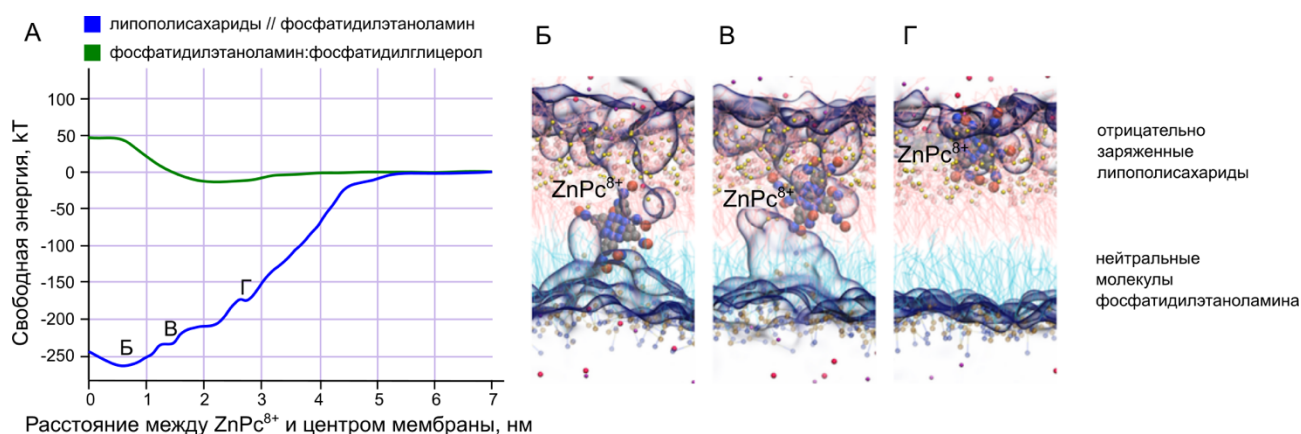


Рисунок 5. (А) Профили свободной энергии для локализации молекулы ZnPc^{8+} в различных областях липополисахаридной и фосфолипидной бактериальных мембран. (Б-Г) Кадры молекулярно-динамических расчетов, демонстрирующие положение молекулы ZnPc^{8+} относительно липополисахаридного бислоя, и соответствующие участкам, отмеченным на профиле свободной энергии. Молекулы липидов показаны голубым, липополисахаридов – розовым. Молекула ZnPc^{8+} показана в виде набора синих, серых и красных сфер увеличенного диаметра, границы водного слоя – в виде фиолетовой полупрозрачной поверхности.

Чтобы проверить, действительно ли водные поры, возникающие при проникновении одиночной молекулы ZnPc^{8+} внутрь мембраны, могут способствовать дальнейшему проникновению других молекул ZnPc^{8+} в соответствии с гипотезой самоиндуцируемого проникновения, был проведен дополнительный молекулярно-динамический расчет длительностью 10 мкс, начиная с конформации, соответствующей глобальному минимуму профиля свободной энергии, с добавлением 10 дополнительных молекул ZnPc^{8+} . В ходе расчета все молекулы ZnPc^{8+} адсорбировались на липополисахаридный монослой в течение первых 5 мкс (Рис. 6 Б). Затем одна из молекул ZnPc^{8+} перемещалась к центру мембраны в течение 2,5 мкс (Рис. 6 В), при этом меняя свою ориентацию с преимущественно параллельной поверхности мембраны на перпендикулярную и демонстрируя возможность самоиндуцированного проникновения.

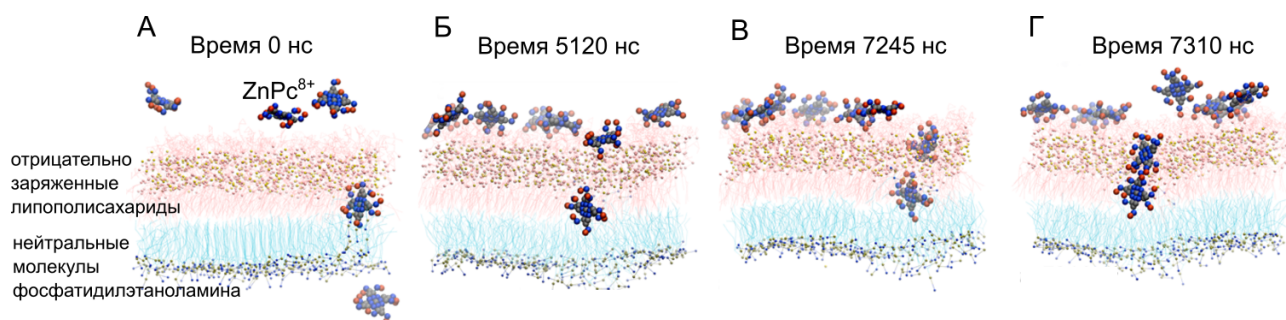


Рисунок 6. Самоиндуцируемое проникновение молекул ZnPc⁸⁺ в липополисахаридную мембрану. Молекулы липидов показаны голубым, липополисахаридов – розовым. Молекулы ZnPc⁸⁺ показаны в виде набора синих, серых и красных сфер увеличенного диаметра.

Изучение взаимодействия катионных фотосенсибилизаторов со структурами оболочки коронавирусов

В отличие от липополисахаридной мембраны молекулы ZnPc⁸⁺ не проявляли сродства к симметричной мембране из нейтрального фосфатидилхолина. Из профиля свободной энергии следует, что при пересечении ZnPc⁸⁺ мембраны из фосфатидилхолина существует значительный энергетический барьер. Профиль свободной энергии, полученный для этой системы, имеет неглубокий максимум ~ 2 kT при 3,2 нм, что соответствует разрушению гидратной оболочки вокруг молекулы ZnPc⁸⁺ при достижении бислоя (Рис. 7 А). Действительно, в соответствующем равновесном молекулярно-динамическом расчете длительностью 1 мкс молекулы ZnPc⁸⁺ не проникали к центру модельного бислоя, располагаясь на расстояниях не менее 3,5 нм от его центра (Рис. 7 Б). Таким образом, мембраны оболочечных вирусов, происходящие из мембран животных клеток и обогащенные нейтральными липидами, слабо связывают поликатионные красители. В то же время, в процессе фотодинамической инактивации оболочечных вирусов в присутствии октакатионного ZnPc⁸⁺ происходит деструкция как поверхностных белков, так и при больших дозах облучения – мембран вирионов [Korneev, 2019]. Как показано в совместной работе с ФИЦ ФТМ [Sharshov, 2021], фотосенсибилизатор ZnPc⁸⁺ проявляет высокую эффективность в инактивации возбудителя пандемии COVID-19, коронавируса SARS-CoV-2.

Другой хорошо известный биоцид, метиленовый синий, проявляет антивирусную активность по отношению к SARS-CoV-2 не только как фотосенсибилизатор при фотовозбуждении красным светом, но и в отсутствии облучения. Это, по-видимому, обусловлено способностью красителя препятствовать связыванию SARS-CoV-2 с клеткой-хозяином [Bojadzic, 2021]. Различие механизмов антивирусной активности ZnPc⁸⁺ и метиленового синего может быть обусловлено взаимодействием этих соединений с разными функциональными областями S-белка.

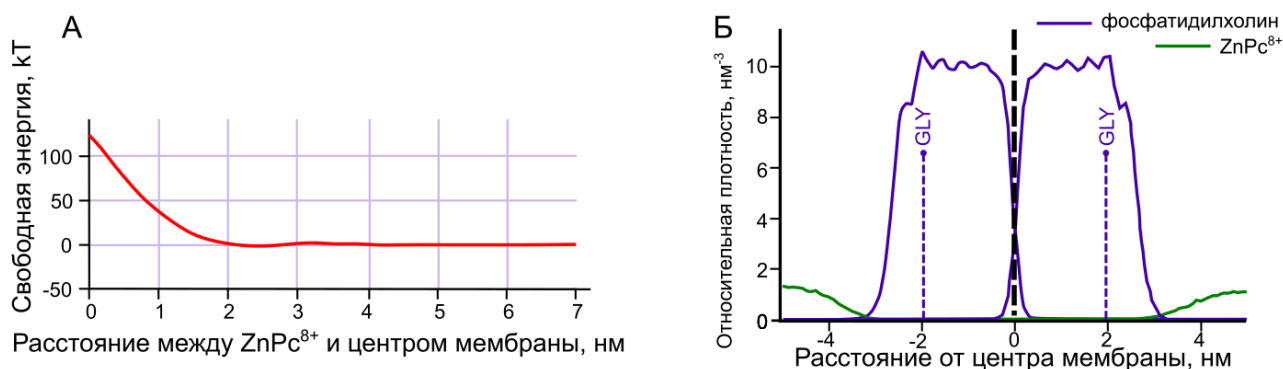


Рисунок 7. Взаимодействие $ZnPc^{8+}$ с модельным бислоем, состоящим из фосфатидилхолина. (А) Профиль свободной энергии для перемещения молекулы $ZnPc^{8+}$ из водного раствора к центру бислоя. (Б) Профили плотности для молекул фосфатидилхолина в присутствии $ZnPc^{8+}$. Границы гидрофобных областей бислоя показаны пунктирными фиолетовыми линиями, центр бислоевой мембраны – жирной черной линией.

Для того чтобы оценить возможные области связывания фотосенсибилизаторов с S-белками коронавирусов SARS-CoV-2, SARS-CoV и MERS-CoV был применен метод броуновской динамики. Для трех белков было построено поверхностное распределение электростатического потенциала. Для «ног» S-белков SARS-CoV (Рис. 8 А) и SARS-CoV-2 (Рис. 8 Б) было показано, что они обладают тремя обширными отрицательно заряженными областями, наибольшая из которых располагается в месте соединения головы и ноги S-белка. В это же время S-белок MERS-CoV (Рис. 8 В) обладает только двумя областями с отрицательным потенциалом, одна из которых также находится на соединении «головы» и «ноги» спайкового белка, а вторая – в области цитоплазматического домена.

Электростатический потенциал неоднородно распределен по поверхности «головы» спайковых белков. На «голове» всех спайковых белков присутствует обширная область отрицательного заряда: для SARS-CoV – на поверхности N-концевого терминального домена (NTD) домена, для MERS-CoV – на линкере между рецептор связывающим доменом (RBD) и белком слияния (FP), для SARS-CoV-2 – на линкере между FP и гептадным повтором (HR1).

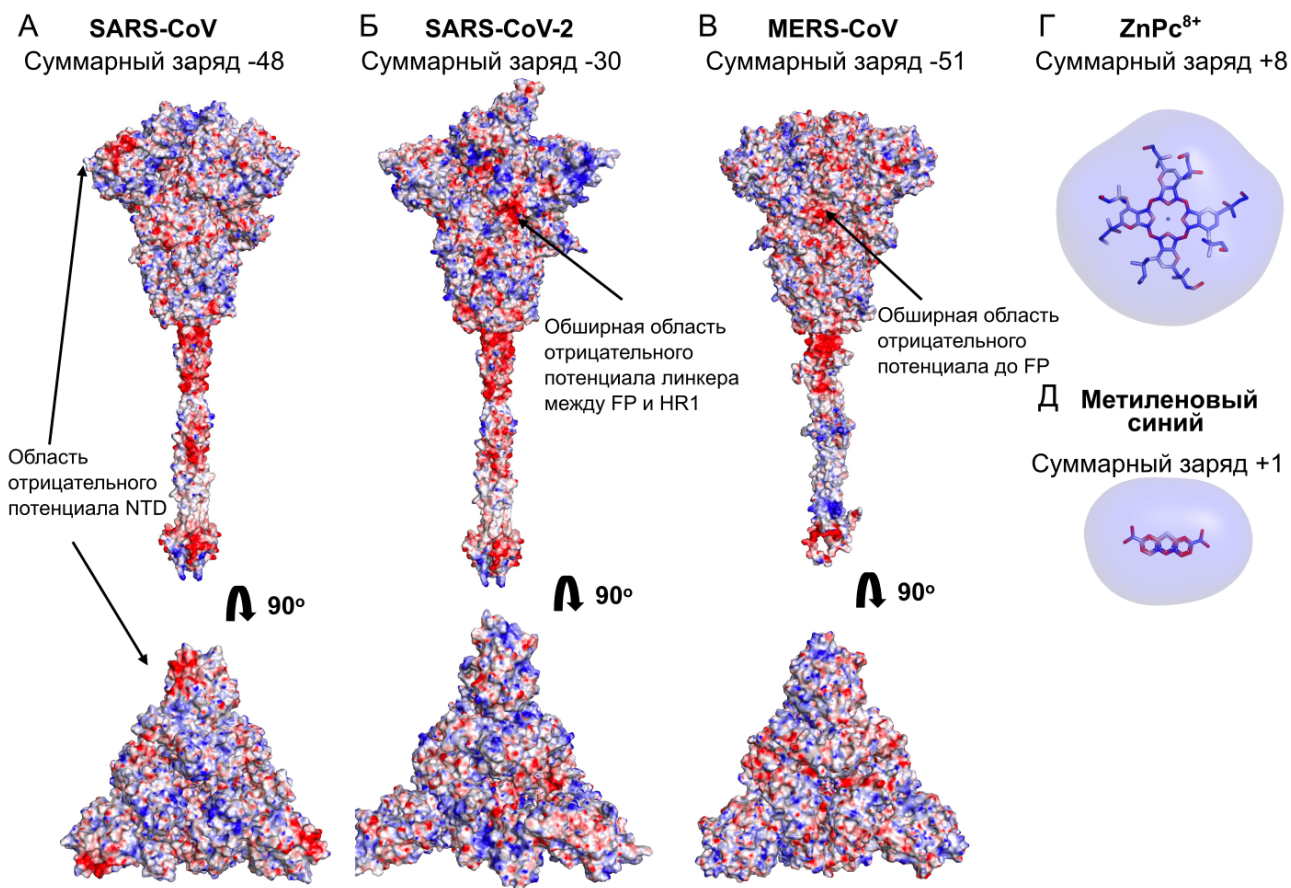


Рисунок 8. Поверхностное распределение электростатического потенциала от -100 мВ (красный) до +100 мВ (синий) S-белков SARS-CoV (А), SARS-CoV-2 (Б) и MERS-CoV (В) вид сбоку (верхняя панель) и вид сверху (нижняя панель). Трехмерные структуры фотосенсибилизаторов ZnPc⁸⁺ (Г) и метиленового синего (Д) с эквипотенциальными электростатическими поверхностями, окрашенными в красный (-7 мВ) и синий (+7 мВ) цвет.

С помощью метода броуновской динамики были получены диффузионно-столкновительные электростатически выгодные комплексы фотосенсибилизаторов с S-белками коронавируса с энергией электростатического притяжения, превышающей 8 kT в случае ZnPc⁸⁺ и 2 kT в случае метиленового синего, обладающего меньшим суммарным зарядом по сравнению с ZnPc⁸⁺. Оба фотосенсибилизатора связываются со всеми исследованными спайковыми белками в области соединения «ноги» и «головы» (Рис. 9). Для молекул ZnPc⁸⁺ было продемонстрировано связывание на «головах» всех трех спайковых белков в обширных областях отрицательного потенциала, созданного заряженными аминокислотами линкера между доменами FP и HR1 для SARS-CoV-2, линкера между RBD и FP для MERS-CoV и NTD для SARS-CoV. Область отрицательного потенциала на «голове» SARS-CoV-2, как и для ZnPc⁸⁺, является центром связывания метиленового синего.

Показанное для SARS-CoV-2 и MERS-CoV связывание катионных фотосенсибилизаторов ZnPc^{8+} и метиленового синего с отрицательно заряженными областями вблизи сайтов расщепления S1 и S2 субъединиц в локусе между RBD и FP, позволяет предположить возможное влияние фотосенсибилизаторов на процесс расщепления S1 и S2 субъединиц. Поскольку ZnPc^{8+} и метиленовый синий связываются с аминокислотами SARS-CoV-2 и MERS-CoV, граничащими с FP, катионные фотосенсибилизаторы также могут влиять на процесс слияния вирусной мембраны с мембраной клетки-хозяина.

Фотосенсибилизаторы ZnPc^{8+} и метиленовый синий связываются с отрицательно заряженной области, расположенной в NTD SARS-CoV, что может препятствовать взаимодействию S-белка с клеточными рецепторами.

Также было показано, что в отличие от ZnPc^{8+} метиленовый синий способен проникать внутрь кармана, образованного аминокислотными остатками, входящими в состав NTD, RBD и HR1 доменов SARS-CoV-2 (Рис. 9). Связывание метиленового синего с этой полостью может влиять на взаимодействие S-белков с ACE2 рецепторами клетки-хозяина и таким образом ослаблять инфекционность вирусов.

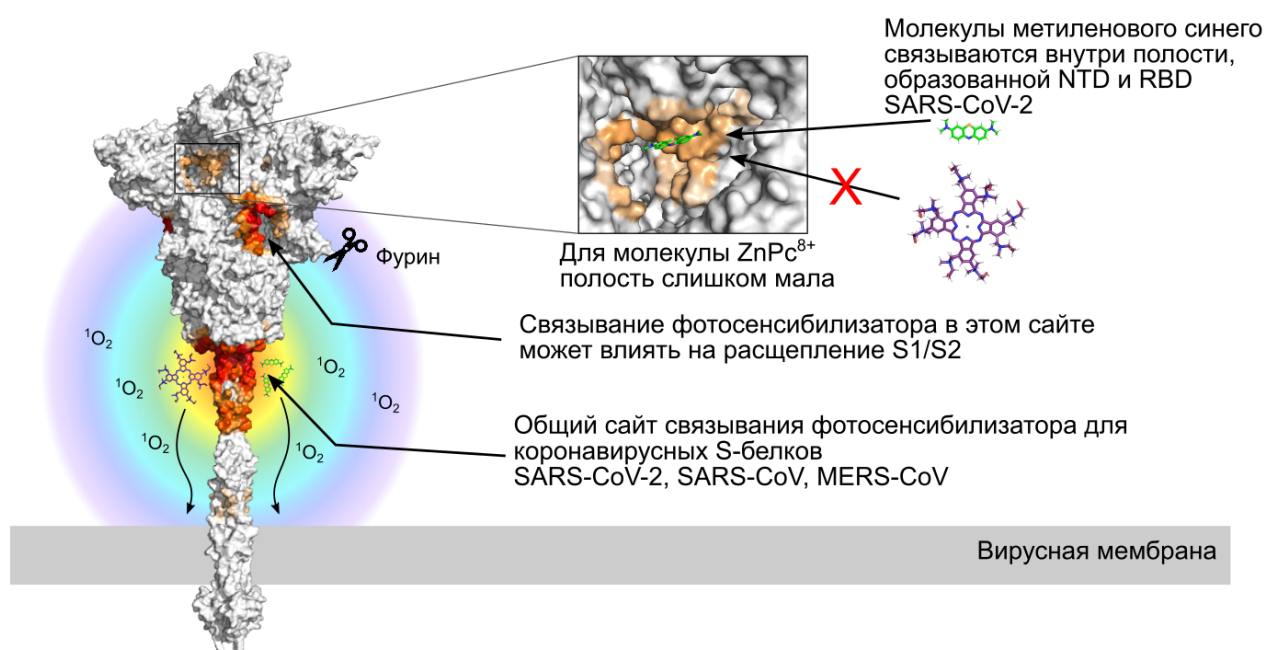


Рисунок 9. Сайты связывания фотосенсибилизаторов ZnPc^{8+} и метиленового синего (1+) на S-белке коронавирусов, найденные с помощью расчетов броуновской динамики.

Заключение

На первом этапе взаимодействия катионных биоцидов с бактериальными клетками происходит их сорбция на отрицательно заряженную клеточную стенку, в то время как основной мишенью является плазматическая мембрана. Нами показано, что антигенные цепи липополисахаридов обеспечивают эффективный барьер для проникновения катионных биоцидов через наружную мембрану грамотрицательных бактерий. Молекулы катионных антисептиков, таких как четвертичные аммониевые соединения и бигуаниды, обладающие сравнительно низкой молекулярной массой, могут преодолеть наружную липополисахаридную мембрану через пориновые каналы и достигнуть плазматической мембраны. При встраивании молекул катионных антисептиков в плазматическую мембрану мы наблюдали изменения параметров бислоя, порога электропорации и времени образования пор. Это позволяет предположить, что механизм действия катионных антисептиков на плазматическую мембрану бактерий может быть связан со снижением трансмембранного потенциала из-за усиленного порообразования, вызывающего разобщение и угнетение дыхательных и осморегуляторных процессов. Однако эффекты, оказываемые антисептиками на плазматические мембраны бактерий, зависят от состава липидов и их локальной концентрации. Так, октенидин из группы четвертичных аммониевых соединений способен дезинтегрировать только кардиолипин содержащие мембраны, характерные для участков плазматической мембраны на полюсах бактериальной клетки.

Молекулы высокомолекулярного октакатионного фотосенсибилизатора $ZnPc^{8+}$ на основе фталоцианина цинка способны проникать через асимметричную мембрану, содержащую во внешнем монослое усеченные формы липополисахаридов без антигенных цепей, путем самоиндуцированного переноса и связываться с мембраной, содержащей отрицательно-заряженные фосфолипиды. Эти две мембраны моделируют наружную и плазматическую мембраны грамотрицательных бактерий. Вместе с тем, нами продемонстрировано отсутствие сродства $ZnPc^{8+}$ к мембранам, содержащим нейтральный фосфатидилхолин. Это соответствует известным экспериментальным данным о значительно более низкой чувствительности к данному фотосенсибилизатору животных клеток по сравнению с бактериальными, а также оболочечных вирусов, мембраны которых происходят из мембран животных клеток.

Деструкция поверхностных белков и мембраны характерна для морфологической картины оболочечных вирусов, подвергнутых фотодинамической инактивации, в том числе, как показано в работах нашей лаборатории совместно с ФИЦ ФТМ (Новосибирск), с фотосенсибилизатором октакис(холинил)фталоцианином цинка. Этот фотосенсибилизатор проявляет высокую эффективность в отношении вирусов птичьего гриппа и коронавируса SARS-CoV-2. Как следует из наших модельных экспериментов, чувствительность к фотодинамической инактивации SARS-CoV-2

может быть обусловлена наличием отрицательно заряженной области, расположенной на соединении «головы» и «ноги» спайкового белка, с которой связываются молекулы катионных фотосенсибилизаторов. Аналогичные области обнаружены нами у спайковых белков коронавирусов SARS-CoV и MERS-CoV. Электростатический потенциал очень неоднородно распределен на поверхности S-белков, однако самая выраженная из областей с отрицательным электростатическим потенциалом на соединении «головы» и «ноги» спайковых белков является общей для всех трех исследованных коронавирусов и представляет доминирующий центр связывания фотосенсибилизаторов. Связывание с этой областью молекул фотосенсибилизаторов на расстоянии всего 10 нм от вирусной мембраны может способствовать эффективному окислительному повреждению не только самих S-белков, но и липидного бислоя. В отличие от ZnPc^{8+} метиленовый синий проявляет антивирусную активность также в отсутствии облучения, что, как мы показали, может быть обусловлено его способностью проникать в полость, образованную аминокислотными остатками, входящими в том числе в состав рецептор-связывающего домена S-белка. Это может приводить к нарушению процесса связывания коронавируса с животными клетками и ингибированию его жизненного цикла.

Итак, методами компьютерного моделирования описаны конкретные пути переноса катионных антимикробных веществ через бактериальную клеточную стенку, выявлены области связывания катионных красителей на спайковых белках коронавирусов. Выявление детальной молекулярной картины взаимодействий катионных соединений разной химической природы с поверхностными структурами бактериальных клеток и оболочечных вирусов необходимо для создания новых эффективных антимикробных препаратов и их рационального использования.

Выводы

1. О-антигенные цепи и полирамнозные антигены создают барьер на пути проникновения катионных антисептиков внутрь клеток грамотрицательных бактерий, улавливая их на расстояниях не менее 4 нм от центра гидрофобной плоскости липополисахаридной мембраны.
2. Катионные антисептики встраиваются в фосфолипидный бислой с составом фосфатидилэтаноламин:фосфатидилглицерол 3:1, характерный для плазматической мембраны тела бактериальной клетки, снижают в 1,5-5,3 раза коэффициенты латеральной диффузии липидов, влияют на параметры порядка жирных кислот, однако не вызывают дезинтеграцию и солюбилизацию бислоя. Антисептик октенидин обладает дезинтегрирующими свойствами в отношении характерной для полюсов бактериальной клетки мембраны состава фосфатидилэтаноламин:фосфатидилглицерол:кардиолипид 81:7:12 (по массе).
3. Процесс проникновения фотосенсибилизатора октакис(холинил)фталоцианина цинка через асимметричную мембрану, содержащую усеченные липополисахариды без антигенных цепей во внешнем монослое и фосфатидилэтаноламин – во внутреннем, энергетически выгоден. Локализация фотосенсибилизатора на расстоянии 0,5 нм от центра гидрофобной плоскости бислоя характеризуется минимумом свободной энергии в $250 kT$. Такая локализация приводит к деформации бислоя и образованию водной поры, облегчающей проникновение других молекул фотосенсибилизатора.
4. Для S-белков коронавирусов SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 характерно гетерогенное распределение поверхностного электростатического потенциала, однако существует общая протяженная область отрицательного электростатического потенциала на соединении «головы» и «ноги» спайковых белков. Эта область участвует в связывании катионных фотосенсибилизаторов октакис(холинил)фталоцианина цинка и метиленового синего.
5. В отличие от октакис(холинил)фталоцианина цинка фотосенсибилизатор метиленовый синий способен также проникать в полость, образованную аминокислотными остатками, входящими в состав нескольких доменов, включая N-концевой терминальный, рецептор-связывающий домены и гептадный повтор, что может объяснять его темновую антивирусную активность.

Основные публикации Холиной Екатерины Георгиевны по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.02 – биофизика. В скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах

1. *Sharshov K., Solomatina M., Kurskaya O., Kovalenko I., Kholina E., Fedorov V., Meerovich G., Rubin A., Strakhovskaya M.* The Photosensitizer Octakis(cholinyl)zinc Phthalocyanine with Ability to Bind to a Model Spike Protein Leads to a Loss of SARS-CoV-2 Infectivity In Vitro When Exposed to Far-Red LED // *Viruses*. – 2021. – V. 13 – №4. – P. 643. DOI: 10.3390/v13040643. IF WoS 5.048. (1.3/0.5).
2. *Fedorov V., Kholina E., Khrushev S., Kovalenko I., Rubin A., Strakhovskaya M.* What Binds Cationic Photosensitizers Better: Brownian Dynamics Reveals Key Interaction Sites on Spike Proteins of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 // *Viruses*. – 2021. – V. 13. – № 8. – P. 1615. DOI: 10.3390/v13081615. IF WoS 5.048. (1.5/0.9).
3. *Kholina E.G., Kovalenko I.B., Bozdaganyan M.E., Strakhovskaya M.G., Orekhov P.S.* Cationic antiseptics facilitate pore formation in model bacterial membranes // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2020. V. 124. – № 39. – P. 8593-8600. DOI: 10.1021/acs.jpcb.0c07212. IF WoS 2.991. (0.9/0.6).
4. *Orekhov P.S., Kholina E.G., Bozdaganyan M.E., Nesterenko A.M., Kovalenko I.B., Strakhovskaya M.G.* Molecular Mechanism of Uptake of Cationic Photoantimicrobial Phthalocyanine across Bacterial Membranes Revealed by Molecular Dynamics Simulations // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2018. – V. 122. – №14. – P. 3711-3722. DOI: 10.1021/acs.jpcb.7b11707. IF WoS 2.991 (1.4/0.7).

Другие публикации Холиной Екатерины Георгиевны по теме диссертации в журналах, входящих в список ВАК. В скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах

1. *Холина Е.Г., Боздаганян М.Е., Страховская М.Г., Коваленко И.Б.* Взаимодействие катионных антисептиков с кардиолипинсодержащей модельной бактериальной мембраной // *Медицина экстремальных ситуаций*. – 2021. – №3. – С. 38-45. DOI: 10.47183/mes.2021.024. (0.8/0.6).