

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

На правах рукописи

Холина Екатерина Георгиевна

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

03.01.02 – Биофизика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
д.б.н. М.Г. Страховская
д.ф.-м.н. И.Б. Коваленко

**Москва
2021**

Оглавление

Введение	3
Глава 1. Обзор литературы	9
1.1. Строение бактериальных мембран	9
1.1.1. Строение наружной мембраны грамотрицательных бактерий.....	9
1.1.2. Строение плазматической мембраны грамотрицательных и грамположительных бактерий	21
1.1.3. Прогресс в моделировании наружной мембраны грамотрицательных бактерий.....	24
1.2. Строение и функциональное значение молекулярных компонентов оболочки коронавируса	30
1.3. Антисептики как антимикробные агенты	32
1.4. Фотосенсибилизаторы как антимикробные агенты	38
Глава 2. Материалы и методы	45
2.1. Измерение дзета потенциала	45
2.2. Основные принципы метода молекулярной динамики	47
2.3. Крупнозернистое силовое поле Martini для исследования биологических систем методом молекулярной динамики	52
2.3.1. Устройство силового поля Martini.....	52
2.3.2. Методика создания крупнозернистых молекулярных моделей антимикробных соединений	55
2.3.3. Детали реализации крупнозернистых молекулярно-динамических расчетов	56
2.4. Метод зонтичной выборки.....	57
2.5. Основные принципы метода броуновской динамики.....	58
Глава 3. Результаты и их обсуждение	62
3.1. Изучение взаимодействия катионных антисептиков с бактериальными мембранами различного состава	62
3.1.1. Создание молекулярных моделей катионных антисептиков.....	62
3.1.2. Создание молекулярных моделей липополисахаридных мембран <i>P. aeruginosa</i> с O-антигенными цепями серотипа O5 и общими полисахаридными антигенами	64
3.1.3. Взаимодействие катионных антисептиков с липополисахаридными мембранами различного состава	69
3.1.4. Взаимодействие катионных антисептиков с плазматической мембраной, состоящей из фосфатидилэтаноламина и фосфатидилглицерола	81
3.1.5. Взаимодействие катионных антисептиков с плазматической мембраной, состоящей из фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерола и кардиолипина.....	90
3.2. Изучение взаимодействия металлофталоцианина цинка с модельными мембранами различного состава	95
3.3. Изучение взаимодействия катионных фотосенсибилизаторов с компонентами оболочки коронавируса.....	104
Заключение	117
Выводы.....	119
Основные публикации	120
Список сокращений	121
Список литературы.....	123

Введение

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 [Erand, 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, мембраны которых происходят из мембран эукариотной клетки-хозяина и содержат преимущественно цвиттерионные фосфолипиды [Korneev, 2019; Kuznetsova, 2009]. 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].

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 вычислительной квантовой химии, 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”, Пушкино, 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.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект 19-34-90045.

Автор благодарит своего научного руководителя Страховскую Марину Глебовну за неоценимую помощь, понимание, участие и поддержку на всех этапах обучения в аспирантуре, постановку задач, помощь в интерпретации результатов и написании статей, Коваленко Илью Борисовича за помощь во всех аспектах, научное консультирование, поддержку и продуктивные обсуждения. Также автор выражает благодарность Орехову Филиппу Сергеевичу за обучение практическим навыкам крупнозернистого моделирования, консультирование на всех этапах исследования, помощь в разработке крупнозернистых моделей, анализе данных МД расчетов и написании статей. Автор благодарит Нестеренко Алексея Михайловича за обучение практическим навыкам молекулярного моделирования, помощь в написании статей и энтузиазм. Автор благодарит своих соавторов Федорова Владимира Андреевича за моральную поддержку и помощь при проведении расчетов и обработке результатов броуновской динамики, Боздаганян Маринэ Евгеньевну и Хрущева Сергея Сергеевича за вдохновляющие обсуждения результатов исследования и идеи.

Автор выражает благодарность сотрудникам кафедры биофизики Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, особенно заведующему кафедрой Рубину Андрею Борисовичу и заведующей сектором информатики и биофизики сложных систем Ризниченко Галине Юрьевне, за создание творческой рабочей атмосферы и ценные замечания, высказанные в ходе выступлений на семинарах сектора информатики и биофизики сложных систем.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Строение бактериальных мембран

1.1.1. Строение наружной мембраны грамотрицательных бактерий

Структура липополисахаридов на примере Pseudomonas aeruginosa и функциональное значение их компонентов

Наружная мембрана, отделенная тонким слоем пептидогликана от плазматической мембраны, входит в состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий и является первой линией защиты клетки, предотвращая проникновение веществ различных химических классов, включая детергенты, антибиотики, токсичные красители и металлы [Nikaido, 2003; Silipo, 2011].

В составе бислойной наружной мембраны клеточной стенки выделяют два монослоя: внутренний фосфолипидный и внешний, одним из наиболее представленных компонентов которого являются молекулы липополисахаридов (ЛПС), составляющие до 75 % от общей площади поверхности клетки [Silipo, 2011]. ЛПС – это класс макромолекул, которые характерны только для грамотрицательных бактерий. Структуру ЛПС принято делить на три участка: (1) липид А, (2) коровую часть и (3) О-антигенную цепь, которая может отсутствовать в структуре. В начале XX века была введена классификация бактериальных клеток по способности формировать шероховатые (R) или гладкие (S) колонии [Jordan, 1926]. Способность к формированию колоний различного фенотипа коррелирует с наличием в структуре ЛПС О-антигенных цепей – S фенотип или их отсутствием – R фенотип [Raetz, 1990]. Одновременно в культуре клеток могут присутствовать как S, так и R формы, которые появляются в результате мутации в генах, отвечающих за биосинтез О-антигенной цепи. В то время как наличие коровой части в ЛПС необходимо для выживания бактериальной клетки в простейших условиях (минимальная необходимая для выживания структура ЛПС – липид А и два остатка 3-дезоксид-D-манно-окт-2-улозоновой кислоты (Кдо) [Raetz, 2002]), экспрессия О-антигена позволяет выживать в естественной среде [Lerouge, 2002]. Поэтому предполагается, что существование бактериальных клеток в R форме является результатом адаптации к культивированию в лабораторных условиях [Jordan, 1926].

По сравнению с шероховатыми формами S формы являются более вирулентными [Jordan, 1926]. На примере патогенов рода *Brucella* (*B. melitensis*, *B. suis*, и *B. abortus*),

возбудителей зоонозной инфекции бруцеллеза, показано, что наиболее высокой степенью вирулентности обладают именно S формы как для человека, так и для их первичных хозяев [Sangari, 1996]. Однако некоторые хорошо известные патогены, например, *Bordetella pertussis* (возбудитель коклюша), *Neisseria meningitidis* (возбудитель менингококковой инфекции), *Haemophilus influenza* (возбудитель гемофильной инфекции) экспрессируют ЛПС без О-антигенных цепей [Caroff, 2020]. Вместо О-антигенов у этих патогенов цепочки олигосахаридов присоединены к липиду А, поэтому такие молекулы называют липоолигосахаридами.

Наиболее консервативный участок ЛПС, липид А, встраивается во внешний монослой наружной мембраны жирнокислотными цепями, таким образом заякоревая ЛПС. По химической природе липид А является гликофосфолипидом, к гидрофильной части которого относится дисахарид глюкозаминил- $\beta(1\rightarrow6)$ -D-глюкозамин с присоединенными к нему в положения 1 и 4' фосфатами, к гидрофобной – присоединенные к сахарофосфатному остову через эфирные и амидные связи в положения 2,3,2',3' жирные кислоты, содержащие 12-14 атомов углерода [Raetz, 1990]. Жирные кислоты липида А могут содержать гидроксильные группы, которые, в свою очередь, могут быть эстерифицированы дополнительными жирными кислотами (вторичные заместители) [Dixon, 2005]. Длина, состав и количество жирных кислот варьирует среди как разных видов грамотрицательных бактерий, так и среди разных штаммов в пределах одного вида. Например, клетки *P. aeruginosa* большинства лабораторных штаммов в составе липида А содержат пять-шесть жирных кислот. Для гексаацильной формы липида А характерна симметричная структура: ко второму положению глюкозамина через амидную связь присоединен 3-гидроксилаурат, к третьему положению через эфирную связь – 3-гидроксидеканоат. К третьему положению 3-гидроксидеканоата присоединена вторичная жирнокислотная цепь – лауриновая кислота, которая может нести гидроксильную группу во втором положении. 75% молекул липида А лабораторных штаммов являются пентаацильными за счет отсутствия 3-гидроксилаурата в глюкозамине I [King, 2009]. Клетки клинических штаммов, выделенные из пациентов с бронхоэктазией, с кровяными и глазными инфекциями, обладают пентаацильной формой липида А, в которой отсутствует остаток вторичной жирной кислоты во втором положении глюкозамина I. Липид А, выделенный из пациентов, страдающих муковисцидозом, находится либо в гексаацильной, либо в гептаацильной форме с дополнительным остатком пальмитата в качестве вторичного заместителя 3-гидроксилаурата в составе глюкозамина II [Knirel, 2006].

Молекулы ЛПС являются эндотоксинами, при попадании которых в кровь запускается иммунный ответ. При этом липид А является главным патоген-ассоциированным молекулярным паттерном ЛПС. В водных растворах молекулы ЛПС, содержащие в составе липида А гидрофобные жирные кислоты, присутствуют в виде мицеллярных агрегатов [Raetz, 1990]. Попад в кровь, мицеллярные агрегаты ЛПС связываются с растворимым белком плазмы крови – ЛПС-связывающим белком [Lu, 2008]. Причем ЛПС-связывающий белок присоединяется к мицеллярному агрегату ЛПС продольно своим N-концевым участком [Kim, 2017]. Затем данный комплекс узнается рецептором CD14, который существует в двух формах: (1) гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный мембранный белок, представленный на поверхности большого количества клеток млекопитающих, преимущественно фагоцитов; (2) растворимый белок плазмы [Lu, 2008]. Трехмерная структура CD14 по форме напоминает подкову, N-концевой участок которой является сайтом связывания ЛПС, а С-концевой – связывается с ЛПС-связывающим белком. Взаимодействие между ЛПС-связывающим белком и CD14 длится всего сотни миллисекунд и обеспечивается электростатическим взаимодействием между положительно заряженными областями С-концевого домена ЛПС-связывающего белка (K319, R322) и отрицательно заряженными областями (D251, D297) на вогнутой поверхности С-концевого участка CD14. После того как CD14 связался с одиночной молекулой ЛПС, он диссоциирует от ЛПС-связывающего белка благодаря электростатическому отталкиванию. ЛПС-связывающий белок, связанный с мицеллярным агрегатом ЛПС, рекрутирует другие молекулы CD14 [Kim, 2017]. Комплекс ЛПС-CD14 транспортируется к гетеродимеру, представленному толл-подобным рецептором 4 (TLR4) и ко-рецептором MD2. MD2 является маленьким белком, обладающим структурой β -сэндвича, похожей на иммуноглобулиновые домены. Молекула ЛПС при взаимодействии с MD2 встраивается внутрь гидрофобного ядра β -сэндвича [Bryant, 2010]. TLR4, в свою очередь, является трансмембранным белком, в состав которого входит внеклеточный домен, содержащий лейцин-богатый повтор (LRR), и глобулярный цитоплазматический домен TIR. Внеклеточный домен обладает структурой изогнутого соленоида и связывается с MD2. Связывание MD2/TLR4 с ЛПС приводит к димеризации комплекса MD2/TLR4. При этом выделяют две области междимерного интерфейса: (1) аминокислотный остаток F126 белка MD2 и L444 в составе гидрофобного участка эктодомена TLR4; (2) участок на латеральной поверхности эктодоменов с центром в районе шестнадцатого аминокислотного остатка LRR [Bryant, 2010]. В результате этого процесса происходит димеризация TIR доменов, приводящая либо к эндоцитозу ЛПС-MD2/TLR4 комплекса, либо к запуску довольно сложного сигнального каскада реакций,

один из вариантов которого кратко можно описать следующим образом. Димер TIR взаимодействует с адапторным белком MyD88, который, в свою очередь, связывается с тирозиновой протинкиназой IRAK4, в результате чего запускается киназный каскад реакций. В ходе киназного каскада происходит фосфорилирование TRAF6, IkK. Фосфорилирование IkK приводит к его диссоциации от ядерного фактора κB (NF κ B). NF κ B, диффундируя через ядерную мембрану, связывается с ДНК и запускает транскрипцию генов, отвечающих за синтез провоспалительных цитокинов, привлекающих другие клетки иммунной системы [Madigan, 2019].

Непосредственно к липиду А прикрепляется коровая часть, которую принято подразделять на внутреннюю и внешнюю. Внутренняя, обладающая высокой степенью консервативности, содержит такие редкие сахара, как Кдо и L-глицеро-D-манно-гептозу (Нер), в то время как в состав внешней коровой части включены более распространенные в природе гексозы [Erridge, 2002]. Кдо, восьмиуглеродный остаток сахара, редко встречается в других гликанах, поэтому считается маркером ЛПС. Это первый сахар внутренней коровой части, который присоединен к липиду А в положение 6'. Олигосахарид, сформированный остальными коровыми сахарами, присоединяется к молекуле ЛПС через кетозидную связь Кдо [Lerouge, 2002].

Внутренняя коровая часть *P. aeruginosa* состоит из двух остатков Кдо и двух остатков Нер. Остатки Нер являются сайтами фосфорилирования, благодаря чему на внутренней коровой части сконцентрирован высокий отрицательный заряд. Примечательно, что сайты фосфорилирования могут быть заняты как одиночными фосфатами, так и ди- и даже трифосфатами. К другим химическим модификациям остатков Нер внутренней коровой части относится карбамилирование второго остатка Нер, а также присоединение фосфоэтаноламина /дифосфоэтаноламина к первому [Knirel, 2006].

Лабораторные и клинические штаммы *P. aeruginosa* обладают очень похожей структурой внешней коровой части, консервативная часть которой состоит из тетрасахарида: одного остатка D-галактозамина, модифицированного аминокислотным остатком L-аланина, и трех остатков D-глюкозы. При этом существуют два варианта внешней коровой части, которые различаются относительным расположением сахаров с образованием гликоформы 1 и гликоформы 2. Гликоформа 1 встречается в составе ЛПС шероховатых, а гликоформа 2 – гладких штаммов. Фактически, отличие гликоформ заключается в том, что во втором варианте остаток L-рамнозы присоединен к остатку глюкозы I, входящей в остов коровой части, а в первом – к боковому остатку глюкозы II

.К тому же, первая гликоформа обладает дополнительным терминальным остатком глюкозы [Knirel, 2006].

Третьим участком молекулы ЛПС являются О-антигенные цепи, которые обеспечивают барьерные функции наружной мембраны по отношению к антимикробным веществам и защиту против комплемент-опосредованного лизиса бактериальных клеток [Caroff, 2020]. Также О-антигенные цепи могут способствовать адгезии к клеткам млекопитающих (например, *Actinobacillus pleuropneumoniae*) или другим различным поверхностям [Caroff, 2003].

По химической природе О-антигенные цепи являются гидрофильными полимерными молекулами, состоящими из повторяющихся фрагментов, в состав которых входит два-, три- или большее количество остатков сахаров. В редких случаях О-антигенные цепи представлены гомополимерами [Luderitz, 1983]. О-антигенные цепи являются самым варибельным участком в структуре ЛПС. Известно по крайней мере двадцать различных сахаров, входящих в их состав, в том числе такие редко встречающиеся природе сахара как колитоза, абеквоза и паратоза [Lerouge, 2002].

Клетки *P. aeruginosa* в пределах одного штамма способны синтезировать в составе молекул ЛПС два варианта антигенных цепей: (1) общий полисахаридный антиген (СРА), (2) О-специфический антиген. Различие в химической природе этих вариантов антигенных цепей подтверждается неспособностью СРА-содержащих ЛПС реагировать с моноклональными антителами к О-специфическим антигенам [Lam, 1989].

Повторяющийся фрагмент СРА, также называемого А-формой, представлен трисахаридом из остатков D-рамнозы, соединенными $\alpha 1 \rightarrow 3$, $\alpha 1 \rightarrow 2$, $\alpha 1 \rightarrow 3$ гликозидными связями [Lam, 2011]. До конца не изученным является биологическая роль СРА. Однако существуют наблюдения, позволяющие пролить свет на этот вопрос. Так, например, показано, что с развитием инфекционного процесса преобладающей формой антигенных цепей в составе клеточной стенки клинических изолятов становится А-форма ЛПС. Такая особенность может являться адаптацией клеток к ответу иммунной системы, эффективно распознающей О-специфические антигены [Lam, 1989]. Также считается, что А-форма ЛПС играет важную роль в способности к адгезии бактериальных клеток к тканям организма-хозяина [Lam, 2011].

Структура О-специфического антигена, в отличие от СРА, не является консервативной. Так, согласно Международной системе серотипирования антигенов выделяют 20 эталонных штамов *P. aeruginosa* с различными вариантами О-антигенов. При этом обнаружено, что по крайней мере 14 из 20 серотипов наряду с О-специфическим антигеном экспрессируют СРА [Lam, 2011]. В отличие от гомополимерного СРА

повторяющийся фрагмент гетерополимерного О-специфического антигена представлен тандемом из 3-5 различных сахаров. Например, повторяющийся фрагмент О-специфического антигена распространенного штамма *P. aeruginosa* PAO1 (серотип O5) представлен тремя сахарами: двумя сахарами, производными уроновой кислоты, и одним остатком N-ацетилфукозамина. В зависимости от количества повторяющихся фрагментов выделяют ЛПС с короткими (12-16 сахаров), длинными (22-30 сахаров), очень длинными (40-50 сахаров) цепями О-специфического антигена. Помимо О-антиген специфических и СРА-содержащих молекул ЛПС в составе клеточной стенки *P. aeruginosa* встречаются либо шероховатые ЛПС без антигенных цепей, либо полужероховатые [Kucerka, 2008] с одним повторяющимся фрагментом О-специфического полисахарида [Lam, 2011]. Присутствие молекул разного типа в составе клеточной стенки зависит от температуры окружающей среды и насыщения кислородом. Так, на клетках штамма PAO1 было показано, что при культивировании микроорганизмов в диапазоне температур от 25 до 45°C в составе клеточной стенки присутствуют все описанные варианты ЛПС, в то время как при 45°C превалируют ЛПС без антигенных цепей [Kropinski, 1987; Makin, 1996]. При выращивании клеток в хемостате при разных значениях парциального давления кислорода клетки штамма PAO1 теряют способность к экспрессии Б-форм антигенных цепей [Sabra, 2003] .

Модификации молекул ЛПС

Для того чтобы выжить в окружающей среде бактериальные клетки выработали множество механизмов защиты, в том числе – модификацию ЛПС. Модификация молекул ЛПС направлена на реализацию двух стратегий адаптации бактериальных клеток: (1) ослабление распознавания иммунной системой организма-хозяина, (2) выработка устойчивости к действию антимикробных соединений [Anandan, 2020]. Среди бактериальных клеток разных видов наблюдается высокое разнообразие ферментов, осуществляющих модификацию молекул ЛПС [Raetz, 2007]. Такие ферменты различаются как по структуре, так и по механизмам катализируемых ими реакций.

Изменение структуры ЛПС может затрагивать разные участки этих молекул, но наибольшее разнообразие характерно для липида А. Модификации молекул ЛПС можно разделить на две группы: (1) направленные на изменение состава и количества жирных кислот в структуре липида А и (2) направленные на изменение суммарного заряда

молекулы ЛПС. К первой группе относятся ферменты PagP, PagL, LpxR, LpxR; ко второй – LpxE, LpxF, LpxT, ArnT, фосфоэтаноламинтрансфераза (ФЭАТ) [Wang, 2010]. В данном разделе освещены известные на данный момент сведения о структуре модифицирующих молекулы ЛПС ферментов и механизмах катализируемых ими ферментативных реакций. Суммарная информация о том, в каких видах бактериальных клеток экспрессируются те или иные ферменты, представлена в таблице 1.1.1.1.

Таблица 1.1.1.1 – Ферменты, модифицирующие липид А и коровую часть ЛПС по [Simpson, 2019]

Фермент	Организм
PagP	<i>Bordetella, Erwinia, E. coli, Klebsiella, Legionella, Pseudomonas, Salmonella, Shigella, Yersinia</i>
PagL	<i>Bordetella, Burkholderia, Pseudomonas, Salmonella</i>
LpxR	<i>E. coli 0157:H7, Helicobacter, Salmonella, Vibrio, Yersinia</i>
LpxO	<i>Bordetella, Klebsiella, Legionella, Pseudomonas, Salmonella</i>
LpxE	<i>Capnocytophaga, Francisella, Helicobacter, Porphyromonas</i>
LpxF	<i>Capnocytophaga, Francisella, Helicobacter, Porphyromonas</i>
LpxT	<i>E. coli, Pseudomonas, Salmonella, Yersinia</i>
ArnT	<i>Bordetella bronchiseptica, Burkholderia, Klebsiella, E. coli, P. mirabilis, Pseudomonas, Salmonella, Shigella, Yersinia</i>
ФЭАТ	<i>Acinetobacter, Capnocytophaga, Cronobacter, E. coli, Haemophilus, Helicobacter, Klebsiella, Neisseria, Pseudomonas, Salmonella, Shigella, Vibrio, Yersinia, Campylobacter</i>

PagP является термоустойчивым интегральным белком наружной мембраны, функция которого заключается в переносе остатка sn-1-пальмитиновой кислоты от фосфолипида к 3-гидроксимиристату, связанному через амидную связь с проксимальным глюкозаминном сахарофосфатного остова липида А. Продуктами ферментативной реакции, катализируемой ферментом PagP, являются лизофосфолипид и пальмитированный липид А. Считается, что биологический смысл биосинтеза фермента PagP заключается в двух вариантах адаптаций грамотрицательных бактерий к условиям окружающей среды: (1) более слабое распознавание иммунной системой за счет снижения афинности модифицированного липида А к молекулам TLR4; (2) уменьшение проницаемости наружной мембраны в результате добавления дополнительной жирнокислотной цепи к липиду А и, как следствие, развитие устойчивости к антимикробным препаратам [Anandan, 2020]. Так, в результате экспрессии PagP возникает устойчивость к антимикробным пептидам протегрину, полимиксину Б, LL-37 и магаинину II в *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* [Joo, 2016].

Структура PagP представлена трансмембранным β -бочонком, состоящим из 161 аминокислоты в составе восьми β -тяжей (А-Н). Внутренняя поверхность β -бочонка выстлана гидрофильными аминокислотами, внешняя – гидрофобными. PagP наклонен на 25° относительно нормали к мембране. Участки белка, находящиеся на границе мембраны

и внеклеточного пространства / периплазмы, выстланы так называемыми поясками из ароматических аминокислот [Evanics, 2006]. Также в структуре PagP присутствует периплазматический N-концевой α -спиральный домен, который располагается рядом с концами β -тяжей В и С и заполняет пространство, образованное из-за наклона β -бочонка по отношению к мембране [Anandan, 2020]. Внутри бочонка располагается сайт связывания субстрата, нижняя часть которого сформирована радикалами ароматических аминокислот, выполняющими функцию углеводородной линейки. Данная структурная особенность определяет специфичность фермента по отношению к пальмитату [Ahn, 2004].

Фермент функционирует через переключение между напряженным и расслабленным состояниями. Считается, что в расслабленном состоянии петля 1 с прилегающим к ней участком способствует проникновению субстрата внутрь кармана, в то время как напряженная конформация белка облегчает ферментативный катализ [Anandan, 2020]. Важными для функционирования фермента являются также остатки пролина в двух ключевых сайтах, которые приводят к ослаблению водородных связей между β -тяжами и способствуют формированию молекулярного ландшафта для латеральной диффузии донорных и акцепторных молекул субстрата внутрь β -бочонка. Первый сайт включает аминокислотные остатки P28 и P50 β -тяжей А и В, образующих β -выпуклость под обладающей динамической подвижностью петель 1, за счет чего формируется окно для проникновения липида А. Аминокислотный остаток K42 обеспечивает специфичность распознавания отрицательно заряженного липида А. Второй сайт содержит остатки P127 и P144 β -тяжей F и G β -тяжей, благодаря чему образуется отступ меньшего размера между соответствующими β -тяжами, необходимый для локализации остатка пальмитата [Khan, 2009].

PagL является ферментом, противоположным по характеру действия ферменту PagP. PagL – липаза, которая осуществляет гидролиз эфирной связи у третьего положения глюкозамина липида А с высвобождением жирной кислоты [Trent, 2001a], однако в отличие от фермента PagP не обладает специфичностью к длине жирнокислотной цепи [Anandan, 2020]. Адаптационное значение фермента PagL для бактериальных клеток схоже с таковым для фермента PagP. У модифицированных PagL молекул ЛПС снижается афинность к рецептору TLR4/MD2 и бактериальные клетки с такими ЛПС являются более устойчивыми к действию катионных антимикробных пептидов [Anandan, 2020].

PagL по трехмерной структуре напоминает фермент PagP. PagL является трансмембранным белком, состоящим из восьми интегральных β -тяжей. Данный белок наклонен относительно нормали к мембране на 30° [Rutten, 2006], межмембранный

интерфейс выстлан поясками из ароматических аминокислот. Однако в отличие от фермента PagP, N- и С-концевые участки обращены в периплазматическое пространство [Anandan, 2020]. PagL является довольно вариабельным по первичной последовательности белком. PagL различных видов грамотрицательных бактерий обладают низким процентом идентичности. При этом консервативными являются четыре аминокислотных остатка: S128, H126, F104, и N136. Каталитический механизм напоминает таковой для сериновой гидролазы, каталитический центр которой традиционно состоит из триады аминокислотных остатков серина, гистидина, аспартата/глутамата. В ферменте, выделенном из клеток *P. aeruginosa*, триада каталитического центра представлена аминокислотными остатками H126, S128 и E140. H126 в ходе ферментативной реакции отрывает протон от S128, после чего S128 осуществляет нуклеофильную атаку на карбонильной углерод расщепляемой связи. При этом важным условием протекания реакции является депротонирование азота в положении $\epsilon 2$ остатка гистидина, что, в свою очередь, возможно при стабилизации азота гистидина в положении $\delta 1$ за счет образования водородной связи с остатком E140. Консервативный аминокислотный остаток F104 за счет взаимодействия с жирной кислотой субстрата предполагается ключевым для правильного расположения молекулы субстрата в его гидрофобном сайте связывания [Rutten, 2006]. Консервативный аминокислотный остаток N136, входит в состав оксианионного центра, необходимого для стабилизации отрицательного заряда на карбонильном кислороде субстрата [Anandan, 2020].

LpxR – еще один фермент, влияющий на структуру гидрофобной части липида А. LpxR является 3'-О-деацетилазой, которая отщепляет от структуры липида А 3'-ацилоксиацильный фрагмент. В отличие от рассмотренных выше ферментов PagP и PagL активность LpxR зависит от ионов Ca^{2+} [Reynolds, 2006]. Данный фермент экспрессируется в клетках многих видов грамотрицательных бактерий, но особое значение имеет для *Helicobacter pylori*. Благодаря активности фермента LpxR липид А *H. pylori* содержит только четыре жирных кислоты, в то время как мутанты по гену *lpxR* осуществляют биосинтез липида А с шестью жирными кислотами. Биосинтез липида А всего с четырьмя жирными кислотами позволяет *H. pylori* успешно избегать сильного ответа иммунной системы человека, что особенно важно, поскольку желудочно-кишечный тракт человека является единственной экологической нишей этого микроорганизма [Rutten, 2009].

LpxR является белком наружной ЛПС мембраны, его структура представлена антипараллельным β -бочонком, состоящим из 12 β -тяжей. N- и С-концевые участки располагаются в периплазматическом пространстве. Интересной особенностью является

наличие в структуре довольно длинного периплазматического поворота T4, в состав которого входит около двадцати аминокислотных остатков. Внутри β -бочонка T4 формирует петлю, закрывающую β -бочонк с периплазматической стороны подобно пробке [Rutten, 2009]. В работе [Rutten, 2009] был предложен механизм ферментативной реакции, схожий с таковым для фосфолипазы A, в котором Ca^{2+} участвует в формировании оксианионной полости, а остаток гистидина активирует молекулу воды, которая атакует карбонильный кислород разрезаемой связи. В состав каталитического центра LpxR *Salmonella typhimurium* входят консервативные аминокислотные остатки D10, T34, E128 и H122. Ион Ca^{2+} координирован остатками D10, T34, а положение H122 стабилизируется аминокислотой E128.

LpxO – белок внутренней плазматической мембраны. Ферментативная активность LpxO заключается в гидроксилировании ацильной цепи липида A в положении 2. Про трехмерную структуру данного фермента известно, что в нем содержится две трансмембранные спирали и активный сайт находится у цитоплазматического мембранного интерфейса. Считается, что биологическое значение данной модификации связано с влиянием на проницаемость наружной мембраны. Так, мутанты по гену *lpxO* способны связывать большее количество молекул гидрофобного красителя [Gibbons, 2008]. Добавление дополнительных гидроксильных групп к жирным кислотам липида A может происходить для компенсации уменьшения их количества в результате действия фермента PagP. Таким образом бактериальные клетки могут поддерживать постоянным число доноров водородных связей, что необходимо для стабилизации молекул ЛПС в наружной мембране [Khan, 2009].

ArnT является ферментом плазматической мембраны, осуществляющим присоединение положительного заряженного остатка сахара 4-амино-4дезоксид-арабинозы к фосфатам в 1 и 4' положения липида A. Остаток аминоарабинозы доставляется к ферменту ArnT с помощью липидного переносчика ундекапренил фосфата, пересекающего цитоплазматическую мембрану и подходящего к периплазматическому интерфейсу ArnT [Trent, 2001b]. Ундекапренил фосфат является важнейшим для бактериальной клетки длинноцепочечным 55-углеродным изопреновым липидом, который участвует в биосинтезе полимеров клеточной стенки: пептидогликана, О-антигенов, тейхоевых кислот [Touze, 2008]. Биологическое значение добавления аминоарабинозы к липиду A состоит в снижении суммарного положительного заряда и, таким образом, к возникновению устойчивости к катионным антимикробным соединениям. Такие модификации, например, показаны для полимиксин-устойчивых штаммов *S. typhimurium* [Helander, 1994] and *E. coli* [Nummila, 1995].

ArnT – белок плазматической мембраны, в котором выделяют трансмембранный и периплазматический домены. Трансмембранный домен содержит тринадцать встроенных в мембрану и одну околосмембранную α -спираль. Между трансмембранными спиралями 7 и 8 находится периплазматическая петля 4, которая обладает важным функциональным значением. Вторичная структура периплазматического домена представлена $\alpha/\beta/\alpha$ -мотивом [Petrou, 2016]. В структуре фермента можно выделить три полости, которые различаются по электростатическим свойствам. Полость 1 является самой большой по размеру и амфифильной по природе. Гидрофобная нижняя часть данной полости является сайтом связывания жирных кислот липида А, в то время как вышележащая гидрофильная область предназначена для связывания с сахарофосфатным остовом липида А. Интересно, что сайт связывания липида А может быть занят периплазматической петлей 4. Полость 2 является гораздо меньшей по размеру по сравнению с полостью 1 и находится недалеко от нее и связана с ней узким гидрофильным участком. Полость 2 служит для связывания с пятью изопреновыми звеньями и фосфатом, который координирован остатком лизина. Полость 3 выстлана гидрофобными аминокислотными остатками и также участвует в связывании ундекапренил фосфата [Petrou, 2016]. При связывании ArnT с ундекапренил фосфатом в периплазматической петле 4 происходят конформационные изменения, что приводит к открытию полости 1 и делает ее доступной для связывания с липидом А [Anandan, 2020].

ФЭАТ является ферментом, осуществляющим перенос фосфоэтаноламина от молекулы донора фосфатидилэтаноламина (PE) к молекуле акцептору ЛПС. Существуют различные ФЭАТ, которые направлены на модификацию разных структурных компонентов ЛПС: липида А, остатков гептозы (добавление фосфоэтаноламина в третье и шестое положения), галактозы и КДО в составе внутренней коровой части. При этом некоторые виды грамотрицательных бактерий синтезируют единственный фермент для модификации разных участков ЛПС, а некоторые – несколько разных [Anandan, 2020]. В силу относительно большого разнообразия ФЭАТ в литературе встречаются разные обозначения данного фермента. В частности, ферменты, модифицирующие коровую часть ЛПС, выделенные из *S. enterica* и *E. coli*, называются CptA (модификация второй гептозы) и EptB (модификация КДО) соответственно. В патогенных видах *Neisseria* обнаружены три фермента: pEtN, или NmEptA, (модификация липида А), Lpt-3 (модификация гептозы третьем положении) и Lpt-6 (модификация гептозы в шестом положении). ФЭАТ, выделенная из *Camphylobacter jejuni*, обозначается как CjEptC и отвечает за модификацию липида А и первой коровой гептозы [Anandan, 2020]. Также недавно был открыт фермент MCR-1, за биосинтез которого отвечает *mcr-1* –

плазмидно-опосредованный мобильный ген устойчивости к колистину. Как следует из названия гена, его локус располагается не на хромосоме, а на плазмиде. Это означает, что ген может передаваться горизонтальным переносом и обеспечивать устойчивость к колистину других видов бактериальных клеток [Anandan, 2020].

NmEptA является структурным белком плазматической мембраны и состоит из N-концевого трансмембранного и С-концевого периплазматического доменов. В составе трансмембранного домена присутствуют пять трансмембранных спиралей, ориентированных практически параллельно друг к другу. Так же, как и в случае ферментов PagP и PagL, в структуре трансмембранного домена присутствуют ароматические пояски, выстилающие мембранные интерфейсы. Активный сайт фермента включает ион Zn^{2+} и нуклеофил активного центра T280, которые находятся в периплазматическом домене, и полость связывания субстратной молекулы POPE, расположенную в обоих доменах. Предполагается, что ферментативный механизм NmEptA похож на таковой для фосфат-трансфераз типа щелочных фосфатаз [Anandan, 2017].

Помимо добавления положительно заряженных остатков снижение суммарного отрицательного заряда может быть достигнуто путем отщепления остатков фосфата от липида А. Ферменты LpxE и LpxF, экспрессируемые *Francisella novicida*, обладают фосфатазной активностью и катализируют отщепление фосфатов от 1 и 4' положений липида А. Критическое значение фермента LpxF для выживания и защиты от антимикробных пептидов иммунной системы человека показано для бактерий типа *Bacteroidetes* [Joo, 2016]. В отличие от LpxE и LpxF, фермент LpxT осуществляет перенос дополнительного остатка фосфата от ундекапренил фосфата к липиду А с образованием 1-ди / трифосфатов [Tian, 2021]. Считается, что при активации LpxE/LpxF и подавлении активности LpxT возникает устойчивость к действию антимикробных препаратов [Joo, 2016]. Недавно также было показано, что фосфорилирование липида А с помощью LpxT играет важную роль в устойчивости *E. coli* к дезоксихолату, компоненту желчи, и способствует колонизации желудочно-кишечного тракта [Tian, 2021].

В регуляции модификаций ЛПС важную роль играют двухкомпонентные регуляторные системы, которые позволяют бактериальным клеткам адаптироваться к изменению условий окружающей среды, включая изменение в концентрации питательных веществ, pH, осмотического давления и присутствию в среде антимикробных веществ. Типичная двухкомпонентная регуляторная система состоит из пары белков – сенсорной гистидиновой протеинкиназы (ГК) и регуляторного белка (РБ). РБ является цитозольным гомодимерным белком. ГК представлена гомодимерным интегральным белком с

рецептором в составе N-концевого домена, расположенного на внеклеточном или периплазматическом интерфейсе, и С-концевого цитозольного киназного домена. Рецептор ГК может чувствовать изменения в окружающей среде либо за счет конформационных изменений белка, либо за счет связывания с лигандом. В результате происходит АТФ-опосредованное аутофосфорилирование цитозольного домена. Затем связанный с аминокислотным остатком гистидина фосфат переносится на остаток аспартата N-концевого домена РБ, что приводит к активации С-концевого домена РБ и позволяет регулировать экспрессию генов [Tierney, 2019]. Наиболее известными и хорошо изученными регуляторными системами грамотрицательных клеток являются PhoPQ и PmrAB. PhoQ – ГК, которая активируется в ответ на низкие концентрации Mg^{2+} и Ca^{2+} или в ответ на присутствие поликатионных пептидов. PhoQ, в свою очередь, активирует РБ – PhoP, который непосредственно влияет на экспрессию ЛПС-модифицирующих ферментов. В случае регуляторной системы PmrAB ГК является PmrB, а PmrA – РБ. В отличие от PhoPQ системы PmrAB реагирует на низкие значения pH или высокую концентрацию Fe^{3+} [Tierney, 2019]. Под контролем PhoPQ системы находятся ферменты PagP, PagL, LpxO. Под контролем системы PmrAB – ферменты ArnT и ФЭАТ [Anandan, 2020].

1.1.2. Строение плазматической мембраны грамотрицательных и грамположительных бактерий

Данный раздел написан с использованием материалов статьи [Холина, 2021]. “Бактериальная плазматическая мембрана играет важную роль в жизни клетки и выполняет множество функций, включая регуляцию транспорта веществ и участие в делении клетки. Плазматические мембраны бактерий состоят из примерно равного количества белков и фосфолипидов. Липиды бактериальной плазматической мембраны варьируют по количеству и длине жирных кислот, образующих гидрофобные хвосты, по количеству и расположению содержащихся в них двойных связей, а также по структуре и заряду гидрофильных голов [Lin, 2016]. Жирные кислоты, которые входят в состав фосфолипидов, во многом определяют такие биофизические свойства бактериальных мембран, как текучесть и проницаемость [Zhang, 2008b]. Регуляция текучести мембран путем изменения соотношения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот представляет один из основных механизмов поддержания мембранного гомеостаза, например при изменяющихся температурах роста.

Электростатические свойства поверхности бактерий играют существенную роль во взаимодействии с заряженными молекулами различных биоцидов. Важнейшей характеристикой физико-химических свойств поверхности бактериальной клетки является поверхностный заряд или дзета-потенциал. Общими для большинства бактерий является нейтральный фосфатидилэтаноламин, и отрицательно заряженные фосфолипиды, фосфатидилглицерол и кардиолипин, составляющих по крайней мере 15 % от общего содержания [Erand, 2011]. К минорным липидам, которые также могут присутствовать в составе плазматической мембраны, относятся фосфатидная кислота, лизил-фосфатидилглицерол, фосфатидилхолин, фосфатидилинозитол, орнитин [Lin, 2016; Strahl, 2017]. Плазматические мембраны грамотрицательных и грамположительных бактерий различаются по составу. Для наиболее изученных модельных видов в таблице 1.1.2.1 указаны соотношения между тремя преобладающими липидами. Из этих данных видно, что фосфатидилэтаноламин является преобладающим липидом в мембранах большинства видов грамотрицательных клеток по сравнению с грамположительными. Содержание кардиолипина, как правило, составляет не более 20 % от общего содержания, за исключением видов, в которых отсутствует фосфатидилэтаноламин. В таких случаях содержание кардиолипина может достигать 50 %.

Таблица 1.1.2.1 – Соотношение фосфатидилэтаноламина (PE), фосфатидилглицерола (PG), кардиолипина (CL) в составе плазматической мембраны некоторых видов грамотрицательных (-) и грамположительных (+) бактерий по [Erand, 2011; Lin, 2016]

Вид	PE, %	PG, %	CL, %
<i>Escherichia coli</i> (-)	80	15	5
<i>Yersinia kristensenii</i> (-)	60	20	20
<i>Proteus mirabilis</i> (-)	80	10	5
<i>Klebsiella pneumonia</i> (-)	82	5	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)	60	21	11
<i>Caulobacter crescentus</i> (-)	0	78	9
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	0	58	42
<i>Streptococcus pneumonia</i> (+)	0	50	50
<i>Bacillus cereus</i> (+)	43	40	17
<i>Bacillus polymyxa</i> (+)	60	3	8

Помимо различного соотношения между фракциями трех основных мембранных липидов в клетках разных видов бактерий, внутри одной клетки может наблюдаться гетерогенное распределение липидов [Matsumoto, 2006]. Так, фосфатидилэтаноламин распределен равномерно в клетках широкого ряда грамотрицательных бактерий (*E. coli*,

Salmonella typhimurium, *Pseudomonas putida*, *Azotobacter vinelandii*, *Proteus vulgaris*.), в то время как в клетках видов *Bacillus* показана его локализация в септах [Strahl, 2017].

Для анионных липидов показано формирование микродоменов. При этом особое внимание в исследованиях было уделено распределению в бактериальных плазматических мембранах кардиолипина, который играет важную роль во многих клеточных процессах. По сравнению с фосфатидилэтаноламином и фосфатидилглицеролом кардиолипин обладает большей молекулярной массой за счет содержания двух фосфатных остатков и четырех жирных кислот. Его распределение в клетках изучают с помощью флуоресцентного красителя 10-N-нонил акридинового оранжевого (НАО). Считается, что НАО характеризуется большим сродством к кардиолипинам по сравнению с другими анионными липидами. НАО встраивается между соседними молекулами кардиолипинов в гидрофобной области, формируемой внешними жирными кислотами. Молекулы НАО формируют параллельные стопки, стабилизированные π - π взаимодействиями. При связывании НАО с кардиолипином происходит сдвиг максимума флуоресценции из зеленой (525 нм) в красную (640 нм) область спектра [Mileykovskaya, 2000]. С применением НАО было показана преимущественная локализация молекул кардиолипина на полюсах и в септах грамотрицательных (*E. coli*, *P. putida*) и грамположительных (*B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*) палочковидных бактерий. Также повышенное содержание кардиолипина на полюсах клеток подтверждено на таких модельных объектах как миниклетки [Mileykovskaya, 2000; Mileykovskaya, 2005; Mileykovskaya, 2009; Strahl, 2017]. Считается, что такая локализация кардиолипина связана с его участием в процессах клеточного деления, в частности с взаимодействием с белками клеточного деления DnaA, MinD, FtsA. DnaA отвечает за инициацию репликации ДНК, MinD в составе системы MinCDE препятствует локализации дивисомы вблизи полюсов клетки, FtsA – бактериальный актин, линкерный белок для бактериального тубулина FtsZ, формирующего в середине клетки Z-кольцо. Данные белки реагируют преимущественно с анионными липидами бактериальной плазматической мембраны за счет наличия в своей структуре амфитропных мотивов, обогащенных положительно заряженными аминокислотами [Mileykovskaya, 2009]. Другими важными клеточными процессами, в которых участвует кардиолипин за счет взаимодействия с белками, являются передача энергии, осмоадаптация и транслокация белков. С помощью рентгеноструктурного анализа продемонстрировано присутствие кардиолипина в структурах реакционного центра и цитохром с оксидазы *R. sphaeroides*, формат- и сукцинат дегидрогеназы *E. coli* [Lin, 2016]. На *E. coli* показана колокализация кардиолипина с осмосенсорным транспортером ProP, реагирующим на изменение

осмоляльности путем усиления транспорта в клетку органических осмолитов, и на *Vibrio cholerae* – колокализация с системой Eps, отвечающей за экспорт холерного токсина [Romantsov, 2010].”

1.1.3. Прогресс в моделировании наружной мембраны грамотрицательных бактерий

Наружные бактериальные мембраны благодаря своей структурной композиции являются довольно сложными для изучения объектами. В то время как исследование более простых симметричных бислойных мембран методами компьютерного моделирования проводится уже довольно давно, прогресс в моделировании наружных ЛПС-содержащих бактериальных мембран достигнут относительно недавно, в течение последнего десятилетия. В данном разделе освещены существующие модели ЛПС-мембран без мембранных белков. Обзор работ, направленных на изучение роли мембранных белков в составе наружной бактериальной мембраны, представлен в статье 2020 г. [Im, 2020].

МД исследования, посвященные созданию наружной бактериальной мембраны, в основном сосредоточены на двух организмах: *E. coli* и *P. aeruginosa* [Im, 2020]. Первая модель ЛПС мембраны *P. aeruginosa* была опубликована в 2001 г. [Lins, 2001]. Доступные на тот момент компьютерные мощности не позволяли исследовать динамику на длительных временах, однако важность данной работы заключалась в разработке алгоритма по созданию ЛПС-мембран. С тех пор разными исследовательскими группами были созданы ЛПС мембраны в различных силовых полях и с разной степенью усложнения ЛПС структуры. Детали работ по созданию шероховатых ЛПС-мембран представлены в таблице 1.1.3.1. В данных исследованиях были оценены разные параметры мембран, основными из которых являются подвижность молекул, распределение различных компонентов в мембране относительно центра бислоя, степень упорядоченности ацильных цепей и площадь, приходящаяся на одну молекулу ЛПС, также часто называемая в литературе площадью на липид. Несмотря на то что площадь на липид трудно определить экспериментальным образом, этот параметр позволяет оценивать, достигла ли исследуемая система равновесия, а также сравнивать между собой различные модельные системы. Приблизительно оценить площадь на молекулу ЛПС можно исходя из количества ацильных цепей в липиде А и экспериментально оцененного по данным рентгеноструктурного анализа значению площади, приходящейся на одну

ацильную цепь шероховатого ЛПС Rd (R7) *Salmonella minnesota* / Rc (SL848) *Salmonella typhimurium* – 0.261 нм² [Snyder, 1999]. Для пентаацильных ЛПС теоретическая оценка площади на липид составляет 1.3 нм², для гексаацильных – 1.566 нм². Как видно из таблицы 1.1.3.1, из всех исследуемых моделей наружных мембран только в работе [Kirschner, 2012] данная величина сопоставима с экспериментальным значением. Во всех остальных работах площадь на ЛПС превышает экспериментальное значение. Скорее всего, это связано с тем, что реальные значения площади на ЛПС, помимо количества ацильных цепей, сильно зависят от структуры ЛПС, степени фосфорилирования и размера коровой части. Так, например, молекула ЛПС *P. aeruginosa* обладает высоким отрицательным зарядом в силу высокой степени фосфорилированности гептоз и большим количеством сахаров в составе коровой части по сравнению с Rd и Rc мутантами *Salmonella sp.*, что может объяснять более высокие значения площади на ЛПС.

Таблица 1.1.3.1 – Существующие модели наружных бактериальных мембран, состоящих из шероховатых ЛПС. Модели приведены в хронологическом порядке их появления. ПА – полноатомные МД модели, КЗ – крупнозернистые. П_{лпс} – площадь, приходящаяся на одну молекулу ЛПС. Значение не приведено – н/п. N_{ац} – количество ацильных цепей в составе липида А. * – разные значения

Организм	МД модель	Состав мембраны	Силовое поле	Длина МД расчета	N _{ац}	П _{лпс} , нм ²	Ссылка
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>P. aeruginosa</i>	ПА	16 ЛПС // 40 POPE	AMBER95, GLYCAM93	100 пс	5	н/п	[Lins, 2001]
<i>P. aeruginosa</i>	ПА	64 ЛПС // 160 POPE	AMBER95, GLYCAM93	10 нс	5	1.08	[Soares, 2008a]
<i>E. coli</i>	ПА	64 ЛПС // 144 PE: 144 P G: 8 DPG	GROMOS 53A 6	200 нс	6	1.854	[Piggot, 2011]
<i>P. aeruginosa</i>	ПА	72 ЛПС // 180 DPPE	GLYCAM06	1 мс	5	1.36	[Kirschner, 2012]
<i>P. aeruginosa</i>	КЗ	1152 ЛПС // 3184 POPE	Martini	3 мс	5	1.718	[VanOosten, 2016]
<i>P. aeruginosa</i>		2304 ЛПС		3 мс	5	1.816	
12 разных видов	ПА	72 ЛПС (липид А) – 20 вариантов	CHARMM36	350 нс	*	*	[Kim, 2016]
<i>E. coli</i>	КЗ	56 ЛПС // 144 POPE: 8 POPG: 8 CDL2	Martini	9 мс	6	1.73	[Hsu, 2017]

Продолжение таблицы 1.1.3.1

1	2	3	4	5	6	7	8
<i>P. aeruginosa</i>	ПА	4 различных варианта липид А: фосфолипиды	GLYCAM06, Slipids	1 мс	5	1.1	[Li, 2018]
<i>S. enterica</i>	ПА	72 ЛПС – 10 вариантов	CHARMM36	7 мс	6,7	*	[Rice, 2018]
<i>E. coli</i>	ПА	7 различных вариантов ЛПС: DPPC // ЛПС: DPPC	CHARMM36	500 нс	6	*	[Hughes, 2019]
<i>Moraxella catarrhalis</i>	ПА	50 ЛОС – 3 различных варианта	CHARMM36	1 мс	7	н/п	[Gao, 2020]
<i>S. enterica</i>	ПА	8 вариантов	CHARMM36	3 мс	6,7	*	[Rice, 2020]

После создания шероховатых мембран следующим достижением МД стало исследование гладких мембран, состоящих из ЛПС с О-антигенными цепями. Детали существующих работ приведены в таблице 1.1.3.2.

В первой подобной работе [Soares, 2008b] была создана асимметричная шероховатая ЛПС *P. aeruginosa* PAO1 с единственной молекулой ЛПС, модифицированной О-антигенной цепью (Б-форма). В исследовании было показано, что присутствие О-антигенной цепи приводит к изменению электростатического потенциала и поверхностного заряда ЛПС мембраны. В работе [Wu, 2013] были созданы симметричные мембраны, содержащие ЛПС с разным количеством повторяющихся фрагментов О-антигенных цепей (0, 5 и 10) в разном соотношении: ЛПС0, ЛПС5, ЛПС10, ЛПС0/ЛПС5 с содержанием ЛПС5 25% и 50%, ЛПС0/ЛПС10 с содержанием ЛПС10 25% и 50. На данных бислоях было показано, что по сравнению с шероховатыми мембранами добавление О-антигенных цепей приводит к увеличению площади на липид и уменьшению значений параметра порядка жирнокислотных цепей липида А. В то же время соотношение О-антигенных цепей различной длины незначительно влияет на значения площади на липид и гидрофобную толщину. Конечные участки О-антигенных цепей являются более гибкими. При увеличении в мембране количества гладких молекул ЛПС О-антигенные цепи становятся конформационно менее гибкими и более ортогонально ориентированными по отношению к мембране. Также было показано [Wu, 2013], что молекулы воды способны проникать во внутреннюю коровую часть.

Первая КЗ модель гладкой ЛПС-мембраны была создана в работе [Ma, 2015] на основе существующей шероховатой ЛПС-мембраны, разработанной Kirschner et al. в

силовом поле GLYCAM [Kirschner, 2012]. КЗ модель О-антигенной цепи была параметризована на основе полноатомной МД симуляции одного повторяющегося фрагмента О-антигенной цепи в силовом поле CHARMM36. Результаты МД расчета показали, что первоначально вытянутая вдоль нормали к мембране О-антигенная цепь переходит в состояние глобулы. По-видимому, разное конформационное поведение может быть обусловлено как химической структурой О-антигенной цепи, так и выбором силового поля. В частности, в работе [Galochkina, 2016] на одиночной молекуле О-антигенной цепи *Salmonella typhimurium*, состоящей из 12 повторяющихся фрагментов, показано различное поведение полимера в двух разных силовых полях: спустя 300 нс МД расчета в силовом поле GLYCAM из состояния идеальной спирали О-антигенная цепь переходит в состояние глобулы, в то время как при расчете в силовом поле OPLS-AA такое поведение не наблюдается.

Таблица 1.1.3.2 – Существующие модели наружных бактериальных мембран, состоящих из гладких ЛПС. Модели приведены в хронологическом порядке их появления. ПА – полноатомные МД модели, КЗ – крупнозернистые. ПФ – повторяющийся фрагмент О-антигена

Организм	МД модель	Тип мембраны	Кол-во сахаров в ПФ	Кол-во ПФ	Силовое поле	Макс. длина МД расчета	Ссылка
<i>P. aeruginosa</i>	ПА	асимметричная	3	4	AMBER95, GLYCAM93	12 нс	[Soares, 2008b]
<i>E. coli</i>	ПА	симметричная – 8 вариантов	5	0/5/10	CHARMM36	100 нс	[Wu, 2013]
<i>P. aeruginosa</i>	КЗ	асимметричная – 10 вариантов	5	5	Martini	10 μ с	[Ma, 2015]
<i>E. coli</i>	ПА	Симметричная – 2 варианта	5	5/10	CHARMM36	400 нс	[Blasco, 2017]
<i>E. coli</i>	КЗ	асимметричная – 4 варианта	5	4	Martini	2 μ с	[Jefferies, 2019]
<i>Vibrio cholerae</i>	ПА	72 ЛПС – 5 вариантов, различаются по липиду А	1	30	CHARMM36	1 μ с	[Luna, 2021]

В нескольких работах было исследовано влияние модификаций липида А на свойства бислоя. В работе [Rice, 2018] было исследовано влияние трех модификаций: гидроксирования, пальмитирования и добавления аминокислоты. Суммарно Rice и Wereszczynski создали 10 вариантов ЛПС мембран с модификациями, представленными в различных комбинациях. Среди трех модификаций наименьший эффект был характерен

для гидроксированных мембран, для которых было показано чуть большее значение площади на липид. Показано, что при гидроксировании образуются дополнительные водородные связи, примерно такое же число которых теряется при пальмитировании липида А. Пальмитирование молекул липида А приводило к увеличению гидрофобной толщины и снижению текучести. Для бислов, модифицированных остатками аминокислот, показано увеличение количества водородных связей и, как следствие, усиление взаимодействия между соседними молекулами ЛПС. В статье 2021 г. [Luna, 2021] объектом исследования были пять симметричных полноатомных ЛПС мембран *Vibrio cholerae*, различающихся по типу липида А. Молекула ЛПС состояла из липида А, коровой части и гомополимерной О-антигенной цепи, представленной 30 сахарами. Каждая модельная мембрана состояла из 72 молекул ЛПС с О-антигенными цепями в обоих монослоях. Типы липида А различались по следующим характеристикам: (1) положениям жирных кислот и их количеству (у типов 1-4 шесть жирных кислот, у типа 5 – восемь); (2) по наличию дополнительных заместителей в виде глицина / диглицина (тип 2 и тип 3) в С3' положении вторичной жирной кислоты и фосфоэтаноламина у 1-фосфата (типы 4,5). Несмотря на разную структуру липида А, значение площади, приходящейся на одну молекулу, было примерно одинаковым для все исследованных типов. Однако для мембраны с липидом А 1 типа, с шестью жирными кислотами и без дополнительных заместителей в структуре, характерно самое низкое значение, а у 5 типа – самое высокое. Для мембран с липидами 2 и 3 типа было показано формирование контактов между аминокислотными группами глицина и остатками фосфата диглюкозамина, что дополнительно подтверждалось уменьшением средней толщины данных мембран.

Отдельное внимание заслуживает CHARMM-GUI – онлайн сервис для создания различных биологических систем, включая мембраны, мицеллы, нанодиски и липосомы [Jo, 2008]. Прорывом в области стало появление в CHARMM-GUI сервиса *LPS Modeler*, позволяющего создавать полноатомные молекулярные модели ЛПС. На данный момент в конструкторе *LPS Modeler* доступны ЛПС структуры 15 видов бактерий, включая 37 вариантов липида А, 52 – коровых частей и 304 – О-антигенных цепей [Lee, 2019]. Создать одиночную молекулу ЛПС, состоящую из всех трех структурных частей, включая О-антигенные цепи, можно для 7 видов: *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*. Наибольшее количество структурных вариантов для О-антигенных цепей доступно для *E. coli* (158), *Salmonella enterica* (60), *Pseudomonas aeruginosa* (33). Полезными особенностями *LPS Modeler* являются: (1) способность комбинировать структурные части внутри молекулы ЛПС одного бактериального вида, (2) возможность

модифицировать остатки коровой части и О-антигена и (3) задавать количество повторяющихся фрагментов О-антигенной цепи. В 2021 г. в конструктор добавили новую опцию – стало возможным выбирать зарядовое состояние фосфатов липидов А как в 1-, так в 4'- положении [Lee, 2019]. Среди вариантов модификаций, доступных для коровой части, присутствуют аминирование, карбоксилирование, добавление остатков этаноламинфосфата, этаноламиндифосфата, N-аланила и N-глицила. Модификация структурных вариантов липида А, представленных в библиотеке, на данный момент не доступна в *LPS Modeler*. Благодаря добавлению библиотек *LPS Modeler* в *Membrane Builder* стало также возможным создавать ЛПС-содержащие мембраны.

Полноатомные вычислительные эксперименты МД несмотря на мощное развитие компьютерных мощностей ограничены размером исследуемой системы и длительностью расчета. Поэтому высокую популярность в течение последнего десятилетия приобрело КЗ молекулярное моделирование. В лаборатории S. Khalid в рамках данного подхода были созданы три КЗ модели ЛПС *E.coli*: REMP(-6) – шероховатый липид А с двумя остатками Кдо, RAMP(-10) – липид А с полной коровой структурой R3 [Hsu, 2016] и OANT(-10) ЛПС с О-антигенной цепью O42 длиной в пять повторяющихся фрагментов [Shearer, 2019]. При этом стоит заметить, что КЗ модель О-антигенной цепи была параметризована на основе полноатомного расчета одиночной О-антигенной цепи в силовом поле GROMOS 53A6. Созданные модели были имплементированы в CHARMM-GUI *Martini Maker* [Hsu, 2017], в котором содержалась ранее довольно обширная библиотека липидов, но отсутствовали ЛПС модели. КЗ модели ЛПС в рамках *Martini Maker* не подвергаются редактированию, то есть нельзя модифицировать структурные компоненты и изменять количество повторяющихся фрагментов О-антигенной цепи. Однако данный конструктор, помимо мембран, позволяет собирать другие ЛПС-содержащие системы, включая липосомы, мицеллы и нанодиски.

На основе имплементированных в *Martini Maker* КЗ моделей ЛПС той же исследовательской группой было изучено влияние состава мембраны на динамику молекул ЛПС с О-антигенными цепями [Jefferies, 2019]. В работе были созданы четыре асимметричные мембраны с липидами POPE:POPG // 9:1 во внутреннем монослое. Состав внешнего монослоя был следующим: (1) OANT – 100 %, (2) OANT:POPE // 4:1, (3) OANT:RAMP // 1:1, (4) OANT:RAMP:POPE // 2:2:1. МД расчеты созданных бислоев проводились в течение двух микросекунд с неполяризуемой водой в качестве растворителя. На системах 2, 3 и 4 было показано, что О-антигенные цепи имеют тенденцию к кластеризации и взаимодействию друг с другом таким образом, чтобы площадь контакта была максимальной. Простым и интересным подходом к оценке

ориентации О-антигенных цепей относительно поверхности бислоя стало применение оценки параметра порядка. Но в отличие от стандартного подхода, где оценивается угол наклона между связями соседних звеньев жирных кислот и нормалью к бислою, оценка проводилась для связей между звеньями остова О-антигенных цепей. Также было показано, что наличие в составе бислоя липидов или шероховатых ЛПС приводит к увеличению подвижности ЛПС с О-антигенными цепями.

1.2. Строение и функциональное значение молекулярных компонентов оболочки коронавируса

Данный раздел написан с использованием материалов статьи [Sharshov, 2021]. “В XXI веке были зафиксированы три вспышки коронавирусных инфекций [1]. В 2003 году коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) вызвал вспышку атипичной пневмонии в 30 странах, более 8000 человек были инфицированы и 812 умерли [World Health Organization, 2021a]. В период с апреля 2012 г. по декабрь 2019 г. коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) заразились 2499 человек в 27 странах и 858 человек умерли [Memish, 2020; World Health Organization, 2021b]. Наконец, коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 типа (SARS-CoV-2) вызвал пандемию COVID-19, которая уже привела к смерти более 46000 из 2,7 миллионов инфицированных (на 19 октября 2021 года) [World Health Organization, 2021c].

Коронавирусы SARS-CoV, MERS-CoV SARS-CoV-2 относятся к роду *Betacoronaviruses*, входящему в семейство *Coronaviridae*, представители которого обладают сферической оболочкой диаметром от 80 до 120 нм и геном которых представлен одноцепочечной плюс-нитевой РНК [Belouzard, 2012]. Геномное сходство SARS-CoV-2 с SARS-CoV и MERS-CoV составляет около 79% и 50% соответственно [Lu, 2020].

Нуклеокапсид оболочечных вирусов окружен липидным бислоем, происходящим из мембраны клетки-хозяина, которая состоит преимущественно из нейтрально заряженных фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина [Ivanova, 2015]. В бетакоронавирусах в состав липидной оболочки входят, по меньшей мере, три типа трансмембранных белков: мембранный белок (М) и белок оболочки (Е), которые участвуют в сборке вируса, а также спайковые белки (S). В то время как М-, и Е-белки обладают короткими N-концевыми эктодоменами [Thomas, 2020], эктодомены S-белков выступают из липидного бислоя на 10–20 нм [Seysan, 2021; Walls, 2016] и образуют

характерную «корону», благодаря чему данная группа вирусов получила свое название. Прямое обнаружение S-белков SARS-CoV-2 в мазках из верхних дыхательных путей позволяет быстро идентифицировать людей, инфицированных COVID-19 [Falzone, 2021].

Количество спайковых белков SARS-CoV составляет 50–100 на вирион; со средним диаметром шипа около 10 нм. Минимальное расстояние между S-белками в вирусной оболочке оценивается в 14–15 нм [Neuman, 2011]. В состоянии, предшествующем слиянию с мембраной клетки-хозяина, S-белок представляет собой гомотример, каждый протомер которого можно разделить на два участка: «голову» и «ногу». В состав одного протомера S-белка входят 1255 аминокислот в случае SARS-CoV, 1273 – SARS-CoV-2 и 1353 – MERS-CoV [Lu, 2015; Walls, 2020]. «Голова» S-белка образована аминокислотами S1 субъединицы, принадлежащими N-концевому терминальному домену (NTD) и рецептор-связывающему домену (RBD), а также аминокислотами S2 субъединицы гептадного повтора 1 (HR1) и белка слияния (FP). «Нога» образована тремя доменами S2 субъединицы: гептадным повтором 2 (HR2), трансмембранным (TM) и цитоплазматическим (CP) доменами [Cai, 2020]. Пространственные структуры S-белков коронавирусов с обозначением доменов представлены на рисунке 1.2.1.

S-белки играют ключевую роль на ранних стадиях жизненного цикла коронавирусов, которая заключается в связывании с рецепторами клетки-хозяина с последующим слиянием вирусной и животной мембран, в результате чего вирус проникает в клетки [Kyrou, 2021]. Основными рецепторами клетки-хозяина, с которыми связываются S-белки SARS-CoV-2 являются ангиотензинпревращающие ферменты (ACE2) [Zhang, 2020], высокая экспрессия которых характерна для эпителиальных клеток легких и других тканей [Tsatsakis, 2020]. Помимо ACE2, дополнительным клеточным рецептором, способствующим проникновению SARS-CoV-2, может служить нейропилин-1 [Kyrou, 2021]. Другим элементом, который SARS-CoV-2 использует для первичного электростатического связывания с клеткой-хозяином, является отрицательно заряженный гепарансульфат, входящий в состав гликокаликса животной клетки. В связывание с гепарансульфатом вовлечен участок RBD S-белка, который состоит из положительно заряженных аминокислотных остатков аргинина и лизина и расположен рядом с областью, участвующей в связывании с ACE2. Предполагается, что SARS-CoV-2 может использовать отрицательно заряженные молекулы гепарансульфата для перехода в «открытое» состояние [Clausen, 2020]. В «открытом» состоянии RBD доступен для связывания с ACE2 рецептором, взаимодействие с которым также имеет электростатическую природу [Xie, 2020]. В отличие от SARS-CoV-2, MERS-CoV использует 5-N-ацетилнейраминую кислоту для первичного связывания с клетками и

дипептидилпептидазу-4 (DPP4) в качестве основного рецептора. Поскольку эти сайты связывания структурно разделены, по-видимому, связывание с сиалозидами потенциально увеличивает связывание MERS-CoV с DPP4 [Park, 2019]. После связывания с рецептором S-белок расщепляется клеточными протеазами, что приводит к разделению субъединиц S1 и S2 и конформационному переходу последней в состояние, облегчающее процесс слияния мембран вируса и клетки-хозяина.”

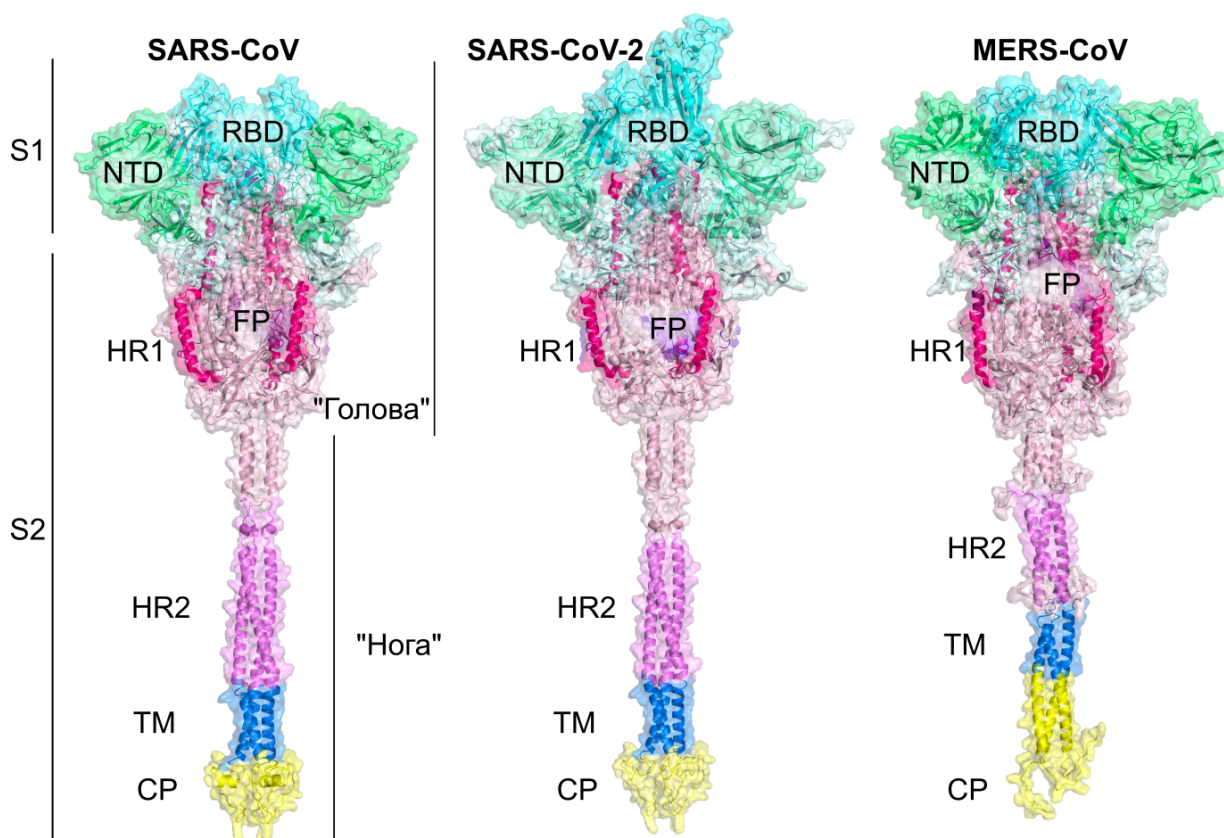


Рисунок 1.2.1 – Трехмерные структуры S-белков SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV раскрашенные в соответствии с доменной организацией

1.3. Антисептики как антимикробные агенты

Антисептики относятся к одной из ключевых групп соединений, активно применяемых для профилактики и борьбы с инфекциями. Активность антисептиков связана с их способностью ингибировать рост (бактериостатический эффект) и инактивировать клетки микроорганизмов (бактерицидный эффект). В отличие от дезинфектантов, используемых для обеззараживания различных поверхностей, в то числе

и медицинских инструментов, антисептики применяются на живых тканях [McDonnell, 1999]. При изучении антимикробной природы действия антисептиков проведены многочисленные исследования, показавшие дезинтеграцию клеточной мембраны с последующим вытеканием внутриклеточных компонентов, нарушение клеточного метаболизма, ингибирование ферментов, угнетение электронного транспорта и окислительного фосфорилирования [McDonnell, 1999], нарушение процесса миграции энергии в фотосинтетических мембранах [Strakhovskaya, 2021]. С помощью электронной микроскопии показаны специфические разрывы бактериальных клеточных стенок [Shalamanov, 2005 Cheung, 2012; Халатян, 2020; Халатян, 2021].

Среди антисептиков одними из наиболее эффективных являются катионные соединения, которые электростатически связываются с элементами клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий и вытесняют стабилизирующие их двухвалентные катионы. Такое электростатическое связывание подтверждается нашими экспериментальными данными по нейтрализации дзета потенциала клеток грамположительных *S. epidermidis* [Халатян, 2019] и грамотрицательных бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa* [Халатян, 2021], а также содержащих до 42 % отрицательно заряженных фосфолипидов хроматофоров пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides* [Strakhovskaya, 2021]. Последующее взаимодействие антисептика с клеткой-мишенью зависит от природы биоцида. Среди катионных антисептиков наиболее обширными группами являются четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) и бигуаниды [Gilbert, 2005].

ЧАС получили свое название за счет того, что в их структуре присутствует четвертичный азот с ковалентно присоединенным к нему гидрофобным заместителем [Gilbert, 2005]. В структуре ЧАС может присутствовать один, два или несколько положительно заряженных атомов азота, или, по-другому, голов. Гидрофобным заместителем, называемым хвостом, обычно является длинная алифатическая цепочка по крайней мере из десяти атомов углерода. Структурный фрагмент, соединяющий заряженные головы, называется линкером. В качестве противоионов в структуре ЧАС часто присутствует либо хлорид, либо бромид [Vereshchagin, 2021]. К представителям негетероциклических ЧАС, несущим единственный положительный заряд, относится мирамистин (MIR), один из популярных антисептиков на российском фармацевтическом рынке. Пространственная структура MIR обладает изогнутой формой и напоминает крюк, в котором голова наклонена к алкильному хвосту [Dolgushin, 2019]. MIR обладает противовирусной, противогрибковой и антибактериальной активностью [Osmanov, 2020]. Так, MIR обладает значительным бактерицидным эффектом против грамположительных

(*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*) и грамотрицательных (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella spp.*) бактерий [Vereshchagin, 2021]. Противовирусная активность MIR показана *in vitro* относительно вируса гриппа А, вируса иммунодефицита человека, вирусов папилломы человека, коронавирусов и аденовирусов [Osmanov, 2020]. В клинической практике MIR используется для лечения кожных и раневых инфекций, обеззараживания ожогов, в стоматологии – для лечения гингивита и в качестве вещества, входящего в состав материалов для пломбирования корневых каналов. Известны случаи применения MIR для лечения назофарингита, тонзиллита, а также в качестве дополнительного средства для лечения бронхита [Osmanov, 2020]. Характерно, что MIR не является токсичным по отношению к клеткам млекопитающих при 1000 мг/л, в то время как CHL токсичен уже при 4-8 мг/л [Osmanov, 2019]. На молекулярном уровне предполагается, что положительно заряженный азот MIR взаимодействует с отрицательно заряженными фосфолипидами, что приводит к нарушению нормального распределения зарядов на поверхности мембраны, а гидрофобный хвост встраивается в бактериальные мембраны, результатом чего становится нарушение их физических свойств и биологических функций. В результате чего действие MIR может сводиться к тому, что (1) маскируются клеточные рецепторы; (2) нарушается целостность мембраны и происходит вытекание внутриклеточного содержимого. При высоких концентрациях MIR может сольубилизовать клеточные мембраны [Osmanov, 2020].

К представителям гетероциклических ЧАС относится антисептик октенидин (ОСТ), в структуре которого два пиридиновых атома азота соединены посредством длинного алкильного линкера, а в пара-положении пиридинового кольца находятся остатки алкиламинов [Vereshchagin, 2021]. ОСТ, несущий два положительных заряда, проявляет высокое сродство к липидам в составе бактериальной мембраны, особенно кардиолипинам. Благодаря своим структурным особенностям ОСТ обладает антибактериальной активностью в отношении широкого ряда грамотрицательных и грамположительных бактерий, включая мецитиллен-резистентные бактерии *Staphylococcus aureus* [Hubner, 2010]. Для большинства видов характерны низкие значения МИК для ОСТ, менее 20 мг/л, только некоторые виды, колонизирующие ротовую полость, менее чувствительны к ОСТ (*Streptococcus mutans* - 120 мг/л, *Streptococcus salivarius* - 800 мг/л) [Kampf, 2018]. Противовирусная активность ОСТ проявляется в инаktivации оболочечных вирусов, таких как гепатит В, вирус герпеса, однако отсутствует по отношению к безоболочечным вирусам [Hubner, 2010]. ОСТ применяется в медицинских целях локально для обработки ран, слизистых оболочек и кожи. ОСТ не является токсичным для человека. На крысах показано, что полуметальная

доза (ЛД₅₀) при внутривенной инъекции водного раствора ОСТ с содержанием феноксиэтанола в течение более семи дней составляет около 10 мг/кг. При внутриоральном приеме ОСТ для крыс ЛД₅₀ составила 800 мг/кг (для хорошо изученного CHL – 635 мг/кг). В том числе, на клетках крови, эритроцитах и гранулоцитах, показано, что их инкубация с 0.05% раствором ОСТ в течение 30 минут не приводила к нарушению метаболических функций [Hubner, 2010]. Комплексное экспериментальное исследование, направленное на выяснение молекулярных механизмов действия ОСТ, опубликовано в статье 2020 г. [Malanovic, 2020]. Инкубация клеток *E.coli* с 0.0001% раствором ОСТ приводила к нарушению целостности наружной ЛПС мембраны, в то время как внутренняя оставалась интактной, наблюдалась агрегация внутриклеточных компонентов, предположительно рибосом. При летальной концентрации 0.0004% ОСТ происходило также локальное повреждение клеточной стенки, преимущественно около полюсов клеток, также внутри клетки наблюдались пустые зоны, формирующиеся при вытекании цитоплазмы. Стоит заметить, что в данной работе на микрофотографиях не наблюдались ярко выраженные разрывы клеточных стенок в отличие от исследований, выполненных на CHL. Проникновение ОСТ внутрь периплазматического пространства и деполяризация плазматической мембраны были непосредственно подтверждены с помощью потенциально-чувствительного зонда [DiSC₃(5)] и косвенно – путем исследования нейтрализации дзета потенциала клеток. Нейтрализация клеточной поверхности наступала при добавлении 10⁻⁶ % ОСТ и при увеличении концентрации до 10⁻³ %, летальной для клеток, не наблюдался сдвиг дзета потенциала в положительную область, что свидетельствует о насыщении связывающих сайтов в наружной мембране. Локализация ОСТ на полюсах клеток была показана с помощью другого красителя - нила красного. Взаимодействие ОСТ с плазматической мембраной было дополнительно подтверждено на везикулах состава PE/PG и PE/PG/CL, для которых было показано увеличение проницаемости на 50 % при добавлении 0.0006% ОСТ, что примерно соответствует соотношению антисептик: липид 1:6.

На основе полученных экспериментальных результатов авторами был предложен следующий молекулярный механизм бактерицидного действия ОСТ [Malanovic, 2020]. На начальном этапе ОСТ связывается с наружной бактериальной мембраной, вследствие чего происходит нейтрализация поверхностного заряда. Гидрофобные участки ОСТ взаимодействуют с ацильными цепями липида А, в результате чего возникает гидрофобное несоответствие и нарушается структура и целостность мембраны. Подобным образом молекулы ОСТ влияют и на плазматическую мембрану, вызывая ее деполяризацию, текучесть и нарушение упаковки ацильных цепей фосфолипидов. В

результате такого неспецифического действия в конечном итоге обе мембраны клеточной стенки повреждаются и внутриклеточное содержимое вытекает наружу.

Бигуаниды относятся к группе соединений, в которых амидиновая группа присоединена к гуанидиновой с образованием $-C=N-C=N-$ конъюгированной системы. К данной группе относится множество соединений, проявляющих антидиабетическую, противовирусную, антисептическую и антималярийную активность [Kathuria, 2018].

Наиболее изученным представителем группы бигуанидов является CHL. CHL представляет собой симметричную молекулу, в состав которой входят две гидрофильные бигуанидиновые группы, соединенные гидрофобным линкером. К каждому остатку бигуанида присоединено хлорфенольное кольцо. Для CHL характерна пространственная конформация в виде скобки [Van Oosten, 2014]. При физиологических значениях pH молекула CHL несет два положительных заряда [Vereshchagin, 2021]. Широкое распространение CHL получил благодаря антимикробной активности по отношению к широкому ряду микроорганизмов, включая бактерии, вирусы и грибы. CHL проявляет антибактериальную активность по отношению к широкому ряду грамположительных и грамотрицательных бактерий, однако в отношении грамположительных бактерий является более эффективным агентом. Некоторые виды грамотрицательных бактерий, такие как *Proteus mirabilis* (МИК составляет 115 мг/л), *Providencia stuartii* (МИК составляет 102 мг/л), проявляют высокую устойчивость по отношению к CHL [Amsterdam, 2014]. Известно, что CHL обладает противовирусной активностью по отношению к оболочечным вирусам, включая ВИЧ [Amsterdam, 2014]. В медицинских целях активно применяется в хирургии в составе средств для обработки рук, для местной обработки ран и участков введения катетеров. Также CHL входит в состав различных продуктов для поддержания гигиены ротовой полости как вещество, предотвращающее образование зубного налета, а также для лечения пародонтоза [Osmanov, 2020].

Изучению антимикробной активности CHL посвящено множество работ. В частности, в работе 1994 г. [Barrett-Bee, 1994] показано влияние CHL на клеточный метаболизм, включая влияние на процессы клеточного дыхания по снижению концентрации АТФ, а также влияние на транспорт малых молекул. Последнее было продемонстрировано на клетках *E. coli*, *S. aureus* и *Providencia stuartii*, для которых наблюдалось снижение поглощения тимидина, глюкозы, глутамина и пролина. Поскольку транспорт пролина является потенциал-зависимым процессом, это свидетельствует о влиянии CHL на мембранный потенциал. Также в данной работе было подтверждено повреждение внешней бактериальной мембраны по измерению в супернатанте количества β -лактамазы, периплазматического фермента, в то время как цитоплазматический

фермент, β -галактозидаза, не освобождался из клетки, что свидетельствует об интактности плазматической мембраны. В 2005 г. другим автором с помощью сканирующей электронной микроскопии в клеточной стенке *Enterobacter cloacae*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens* были показаны морфологические изменения, включающие множественные разрывы, трещины, микровздутия и бороздки, полости [Shalamanov, 2005]. Позднее, в 2012 г. в статье [Cheung, 2012] с помощью электронной микроскопии были показаны морфологические изменения в бактериальной клеточной стенке под действием CHL. При этом авторами показана разница в действии на клетки *E. coli* и *B. subtilis*: в то время как множественные точечные повреждения были обнаружены на *E. coli* по всему телу клетки, на клетках *B. subtilis* разрывы наблюдались преимущественно на клеточных полюсах. Суммарно бактерицидное действие CHL сводится к следующим эффектам: (1) повреждение клеточной стенки, ингибирование клеточного дыхания, вытекание внутриклеточного содержимого при низких концентрациях, (2) осаждение белков и нуклеиновых кислот, коагуляция внутриклеточных компонентов и нарушение активности ферментов при высоких концентрациях [Amsterdam, 2014].

Другим представителем бигуанидов является пиклоксидин (PIC), входящий в состав препаратов глазных капель для профилактики и лечения бактериальных инфекций конъюнктивы. По химической структуре пиклоксидин напоминает CHL, однако обладает более жестким пиперазиновым линкером между бигуанидиновыми группами. По сравнению с упомянутыми выше антисептиками, исследованию бактерицидной природы действия PIC посвящены единичные работы. В совместных исследованиях нашей лаборатории с НИИ глазных болезней и НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи показано, что добавление PIC приводит к нарушению морфологии как грамположительных, так и грамотрицательных клеток. Так, при инкубировании выделенных с конъюнктивы изолятов коагулазонегативных стафилококков, среди которых преобладали штаммы *S. epidermidis*, в течение 15 мин с 500 мкг/мл PIC происходила нейтрализация дзета потенциала и его смещение в область положительных значений, вследствие чего наблюдалось слипание клеток и появление вокруг них аморфного вещества. При инкубировании клеток в течение часа при более низкой концентрации PIC 31 мкг/мл в клеточных стенках появлялись округлые поры диаметром 12-23 нм [Халатян, 2019; Халатян, 2020]. В то же время для грамотрицательных клеток *E. coli* в тех же условиях наблюдалось более значительное повреждение клеточной стенки в виде формирования пор диаметром 23-82 нм и ярко выраженных разрывов на полюсах клеток. Для более устойчивого к действию биоцидов вида *P. aeruginosa* была показана нейтрализация поверхностного потенциала лишь при концентрации PIC 500 мкг/мл и отсутствие

видимых повреждений клеточной стенки при действии РИС 31 мкг/мл в течение часа. Однако в таких условиях клетки разбухали, их длина уменьшалась и, как и в случае *S. epidermidis*, слипшиеся в агрегаты клетки были окружены выраженным матриксом из аморфного вещества [Халатян, 2021].

Несмотря на большой объем экспериментальных данных, эти сведения не позволяют четко ответить на вопрос, что является первопричиной бактерицидного действия антисептиков – дезинтегрирование мембраны или угнетение клеточного метаболизма. Таким образом, точные молекулярные механизмы действия данной группы антимикробных веществ не известны. Остается также неясной роль конкретных компонентов клеточных стенок бактерий во взаимодействии с молекулами антисептиков и в формировании устойчивости к определенным препаратам.

1.4. Фотосенсибилизаторы как антимикробные агенты

С начала открытия фотодинамической терапии (ФДТ) и первого успешного ее применения для лечения кожной карциномы прошло более ста лет. Однако в то время как противораковая ФДТ уже около 30 лет активно применяется в клинической практике, в том числе для лечения базальноклеточной карциномы и актинического кератоза, разработки метода фотодинамической инактивации микроорганизмов активизировались только в 90-х годах из-за возникновения антибиотикорезистентных видов и необходимости разработки альтернативных методов борьбы с ними [Cieplik, 2018]. В настоящее время показана возможность применения ФДТ для борьбы с патогенами широкого класса, включая бактерии, вирусы, грибы и паразиты. Преимуществами антимикробной ФДТ по сравнению с классическими подходами является простота применения, использование неинвазивных источников света и отсутствие устойчивости микроорганизмов к активным формам кислорода (АФК) [Hamblin, 2016].

ФДТ основана на использовании трех компонентов: красителя, называемого фотосенсибилизатором (ФС), света и кислорода. При поглощении кванта света определенной длины волны ФС из основного состояния $^0\text{ФС}$ переходит в синглетное возбужденное состояние $^1\text{ФС}^*$, которое в результате внутримолекулярной конверсии приводит к образованию более долгоживущего триплетного состояния $^3\text{ФС}^*$. В таком состоянии ФС взаимодействует с молекулами субстрата по двум возможным механизмам [Foote, 1991], в результате чего образуются АФК, которые обеспечивают необратимое повреждение клеток-мишеней. Фотосенсибилизированные реакции I типа сопровождаются переносом электрона с $^3\text{ФС}^*$ на биомолекулу с образованием анион-

радикала $^3\text{FC}^-$, который взаимодействует с молекулой триплетного кислорода ($^3\text{O}_2$) с формированием супероксид анион-радикала (O_2^-). Из молекулы O_2^- в результате реакции дисмутации образуется перексид водорода H_2O_2 . Молекулы H_2O_2 могут вступать в реакцию Фентона (взаимодействие с двухвалентным железом) с образованием высоко реакционноспособных молекул гидроксильного радикала ($\text{HO}\cdot$). В реакциях II типа происходит перенос энергии возбуждения между ^3FC и $^3\text{O}_2$ с образованием высокореакционного синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$). Отдав энергию возбуждения молекула FC переходит в состояние ^0FC , таким образом будучи снова готова к поглощению нового кванта света с образованием $^1\text{O}_2$. По оценке [Cieplik, 2018] одна молекула FC II типа способна образовать около 1000 молекул $^1\text{O}_2$.

Для эффективной фотодинамической инактивации микроорганизмов FC должен обладать следующими свойствами [Klausen, 2020; Kwiatkowski, 2018]: (1) длительным временем жизни триплетного состояния для образования $^1\text{O}_2$ с высоким квантовым выходом; (2) хорошей растворимостью в водной среде; (3) низкой темновой токсичностью в отношении клеток млекопитающих; (4) высокой фотоустойчивостью и стабильностью при комнатной температуре; (5) высокой чистотой образца без химических загрязнений; (6) высокой селективностью к микробным мишеням.

Среди используемых в а антимикробной ФДТ (аФДТ) FC можно выделить следующие основные классы: (1) производные фенотиазина, (2) тетрапирролы, (3) природные FC , (4) наноструктурные соединения. Фенотиазины являются синтетическими FC с максимумом поглощения зачастую в красной области спектра (600-680 нм). К наиболее известным среди них относятся метилиновый синий и толуидиновый синий [Ghorbani, 2018]. Фенотиазины являются соединениями, в состав которых входит гетероцикл из трех колец π -сопряженной системы. Поскольку квантовый выход $^1\text{O}_2$ для фенотиазинов ниже 0.5, считается, что они могут также действовать по I типу реакций [Cieplik, 2018]. Так как большинство представителей фенотиазинов обладают положительным зарядом, они являются эффективными в отношении широкого ряда бактерий. Введение в структуру гетероцикла дополнительных катионных заместителей, например, функционализация метиленового синего, приводит к лучшему связыванию и поглощению как клетками грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [Ghorbani, 2018]. FC данного класса впервые были одобрены для применения в клинической практике стоматологов и считаются стандартами при исследованиях *in vitro* [Cieplik, 2018].

К природным FC относятся кумарины, фуранокумарины, бензофураны, антрахиноны и производные флавинов. Наиболее изученными среди них являются

гиперицин и кумарин [Ghorbani, 2018]. Гиперицин является ароматическим полициклическим соединением производным антрахинона с максимум поглощения в оранжевой области спектра (600 нм), выделенным из *Hypericum perforatum*. Интересным фактом является то, что экстракт из этого растения долгое время применялся для лечения депрессии в легкой форме [Oniszczyk, 2016]. Гиперицин обладает фотодинамической эффективностью в отношении ряда грамположительных бактерий, в том числе клинических изолятов метицилин-чувствительных и метицилин-устойчивых *Staphylococcus aureus* [Ghorbani, 2018]. Куркумин – краситель ярко выраженного желтого цвета, выделяемый из корней *Curcuma longa*, с оптимумом поглощения в синей области спектра (405-435 нм). Главным преимуществом куркумина является его низкая стоимость. К недостаткам можно отнести ограниченную растворимость в воде, вследствие чего куркумин используют совместно с маслами и синтетическими растворителями [Oniszczyk, 2016]. Как ФС куркумин более эффективен в отношении грамположительных бактерий. Так, показана его более чем в 300 раз высокая эффективность в отношении *S. aureus* по сравнению с грамотрицательными *E. coli* и *Salmonella typhimurium*. В отсутствии освещения антибактериальное действие куркумина может быть приурочено к связыванию с белками FtsZ, гомологами эукариотического тубулина, что было показано на клетках *Bacillus subtilis* [Ghorbani, 2018].

Тетрапирролы – довольно распространенная группа ФС, также названная пигментом жизни за счет широкого распространения в природе. К тетрапирролам относятся часто используемые при ФДТ группы ФС: фталоцианины и порфирины [Ghorbani, 2018]. Порфирины – гетероциклические соединения, состоящие из четырех пиррольных колец. Наиболее эффективными ФС в антимикробной терапии являются катионные порфирины. Считается, что катионные порфирины эффективно проникают в бактериальную клетку за счет самоиндуцируемого поглощения. Помимо этого, порфирины активно используются в противоопухолевой терапии благодаря их способности накапливаться в раковых клетках. Для порфиринов характерна основная полоса поглощения является при 400 нм (полоса Core) с высоким значением коэффициента экстинкции [Oniszczyk, 2016].

Фталоцианины – макроциклические соединения с максимумом поглощения в красной и инфракрасной области (650-700 нм), обладающие обширной делокализованной 18-электронной π -системой [Moreira, 2008]. Зачастую фталоцианины существуют в форме комплексов с металлами, среди которых наибольшую популярность получили фталоцианины цинка благодаря высокой фотостабильности, более долгим временам жизни триплетного состояния и высокой продукции АФК. Недостатком использования

данных соединений в качестве ФС является их низкая растворимость даже в органических растворителях из-за склонности к формированию димеров и олигомеров благодаря обширной π -системе [Oniszczyk, 2016]. Данное ограничение преодолевают путем введения в структуру макроцикла заряженных заместителей, которые предотвращают агрегацию и тем самым способствуют увеличению квантового выхода образования $^1\text{O}_2$. Так, для октазамещенных соединений квантовый выход образования $^1\text{O}_2$ достигает 0.6-0.65 [Makarov, 2009]. Введение в структуру макроцикла положительно заряженных заместителей также способствует более эффективному электростатическому связыванию с отрицательно заряженными структурами бактериальных клеточных стенок. Катионные фталоцианины цинка являются эффективными ФС по отношению как грамположительным, так и грамотрицательным бактериальным клеткам [Strakhovskaya, 2009], а также оболочечным вирусам, у которых в процессе фотодинамической инактивации с октакатионным ZnPc^{8+} на первом этапе происходит повреждение и отстединение поверхностных белков, а при увеличении дозы облучения деструкция мембран вирионов [Korneev, 2019].

К представителям наноструктурных соединений относятся фуллерены, углеродные молекулы в форме сферических многогранников, наиболее изученным из которых является фуллерен из 60 атомов углерода. Благодаря обширной π -конъюгированной системе фуллерены эффективно поглощают свет в ультрафиолетовой и видимой области спектра. В зависимости от химических модификаций фуллерены являются ФС, которые действуют как по I, так и по II механизму [Cieplik, 2018].

К биомишеням ФДТ относятся белки, липиды и нуклеиновые кислоты, суммарная информация по продуктам окисления которых представлена в таблице 1.4.1.

Таблица 1.4.1 – Продукты фотоповреждения основных биомолекул клетки по [Vatansever, 2013]

Мишень	I тип	II тип
Белки	Кросс-сшивки, карбонилирование	Кросс-сшивки, протеолиз
Липиды	Реакции цепного окисления	Образование гидропероксидов липидов
Холестерин	5-и 6-гидропероксиды	7-гидропероксиды
Нуклеиновые кислоты	5-карбоксамидо-5-формамидо-2-иминогидантоин	8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозин

Фотоповреждение липидов может протекать либо по контактно-независимому, либо по контактно-зависимому от ФС пути. При контактно-независимом пути инициатором повреждения выступает $^1\text{O}_2$, который взаимодействует с холестерином или

ненасыщенными жирными кислотами липидов по Альдер-еновой, или еновой, реакции. В результате еновой реакции образуются изомерные формы гидропероксидов аллильных липидов в *E* (*транс*) конфигурации. Так, при окислении олеиновой кислоты 18:1 Δ^9 с единственной двойной связью в *Z* (*цис*) конфигурации образуются два *E* изомера 18:1 Δ^{10} и 18:1 Δ^8 , несущих ООН-группы в положениях 9 и 10 соответственно [Bacellar, 2019].

При контактно-зависимом пути происходит радикальное перекисное окисление липидов (ПОЛ), которое принято делить на три фазы: инициация, распространение, обрыв цепи. Инициация ПОЛ является фазой образования алкильных радикалов, часто обозначаемых как R $\cdot$, за счет атаки преимущественно полиненасыщенных жирных кислот липидов свободными радикалами. Далее начинается фаза распространения ПОЛ, в которой алкильные радикалы взаимодействуют с кислородом с образованием пероксильных радикалов, часто обозначаемых как ROO $\cdot$. Последние могут акцептировать протон от неокисленных липидов, что приводит к образованию гидропероксидов липидов, обозначаемых как ROOH, и новых алкильных радикалов. На поздних стадиях ПОЛ при взаимодействии гидропероксидов липидов с ФС могут образовываться либо пероксильные, либо алкоксильные радикалы. Последние обозначают RO $\cdot$. Все рассмотренные радикалы могут взаимодействовать с другими неокисленными молекулами, способствуя увеличению уровня ПОЛ. В тот момент, когда сталкиваются две молекулы радикала, цепочка ПОЛ завершается [Bacellar, 2019].

Гидропероксиды липидов, алкильные, пероксильные, алкоксильные радикалы могут превращаться в нерадикальные продукты. Алкильные радикалы могут образовывать стабильные липидные димеры. Гидропероксиды могут восстанавливаться до соответствующих спиртов. При столкновении двух пероксильных радикалов образуется нестабильный тетроксидный димер, который распадается на кетон, спирт и молекулярный кислород (механизм Рассела). Алкоксильные радикалы при отрыве атомов водорода от неокисленных жирных кислот или от гидропероксидов образуют спирты (ROH). Также при β -расщеплении алкоксильного радикала образуются усеченные липидные альдегиды. β -расщепление RO $\cdot$ представляет собой реакцию гомолитического разрыва C-C связи, прилегающей к -O $\cdot$ Группе [Bacellar, 2019].

Биологическое значение ПОЛ связано с изменением свойств мембраны, включая снижение текучести и увеличение проницаемости (важную роль в данном процессе играют усеченные липидные альдегиды). Также, поскольку при ПОЛ образуется множество продуктов распада, включая высокореактивные малоновый диальдегид и 4-гидрокси-2-ноненаль, может происходить нарушение структурно-функциональной активности мембранных белков [Kashef, 2017].

При фотоинактивации наблюдается также нарушение структуры и функции белков, образование белковых агрегатов из-за формирования множественных кросс-сшивок в результате взаимодействия белков с радикалами. В то время как некоторые из них высоко реакционноспособны, как, например $\text{HO}\cdot$, и взаимодействуют со всеми аминокислотами, другие проявляют большую специфичность (таблица 1.4.2) [Davies, 2016].

Таблица 1.4.2 – Основные аминокислотные мишени некоторых окислителей по [Davies, 2016]

Окислитель	Аминокислота
$^1\text{O}_2$	Цистеин, метионин, триптофан, тирозин, гистидин
H_2O_2	Цистеин, селеноцистеин
$\text{HO}\cdot$	Все аминокислоты
$\text{RO}\cdot$	Большинство аминокислот
$\text{ROO}\cdot$	Цистеин, метионин, триптофан, тирозин
$^1\text{O}_2\cdot$	Радикалы тирозина и триптофана

Большинство реакций взаимодействия радикалов с белками протекают по трем сценариям: (1) отрыв атома водорода от атомов углерода, азота, кислорода и серы; (2) отрыв электрона и (3) присоединение к аминокислотам, в состав которых входят ароматические кольца и атомы серы [Hawkins, 2019]. В первой группе реакций происходит образование радикалов: алкильных ($\text{R}\cdot$), тиольных ($\text{RS}\cdot$), первичных индольных радикалов триптофана и первичных феноксильных радикалов тирозина. $\text{RS}\cdot$, индольные радикалы триптофана и феноксильные радикалы тирозина более склонны к образованию продуктов кросс-сшивок RSSR и димеров Trp-Trp , Tyr-Tyr . Алкильные радикалы также способны к образованию димеров R-R , но при высокой концентрации кислорода могут реагировать с ним с образованием $\text{ROO}\cdot$. В свою очередь, $\text{ROO}\cdot$ либо отрывает атом водорода с образованием гидропероксида ROOH , либо димеризуется с образованием тетроксидов ROO-OOR , который (в случае третичного радикала) распадается на молекулу кислорода и два алкоксильных радикала ($\text{RO}\cdot$). $\text{RO}\cdot$ может отрывать атом водорода с образованием продукта со спиртовой группой ROH , либо вступать в реакцию фрагментации с образованием алкильного радикала и карбонила. Особое значение имеет как повреждение боковых цепей аминокислот в составе белков, так и повреждение свободных аминокислот. Помимо боковых цепей аминокислот фотоповреждения могут затрагивать белковый остов за счет отрыва атома водорода от α -углерода с последующей дефрагментацией пептидного остова [Hawkins, 2019].

При аФДТ наблюдаются повреждения РНК, геномной ДНК и ДНК плазмид. АФК атакуют как азотистые основания, так и остатки сахаров, в результате чего образуются одно- и двунитевые разрывы в сахарофосфатном остове, аддукты и кросс-сшивки с другими молекулами [Kashef, 2017]. Среди оснований наиболее эффективному окислению подвергаются гуаниновые основания с образованием 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина и 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формамидопиримидина. Повреждения нуклеиновых кислот могут вызывать мутации и блокировать репликацию ДНК [Almeida, 2015].

В то время как механизм антимикробного действия антибиотиков направлен на специфические клеточные мишени, этого нельзя сказать об аФДТ. АФК, которые образуются при аФДТ, воздействуют на множество важных биомолекул в составе клетки, включая белки, липиды, нуклеиновые кислоты. При этом основным эффектом при фотоинаktivации бактериальных клеток принято считать нарушение структурных и функциональных характеристик мембран [Almeida, 2015]. Поскольку время жизни $^1\text{O}_2$ довольно короткое и составляет примерно 10-320 нс, диффузия $^1\text{O}_2$ в клетках ограничена радиусом в 10-55 нм. [Agostinis, 2011]. Поэтому окислительное повреждение происходит при близком контакте ФС с молекулами субстрата. При этом можно выделить три варианта взаимодействия молекулы ФС с клеткой-мишенью [Alves, 2014; Cieplik, 2018]: (1) ФС находится близко к клеточной поверхности, но эффективного связывания не наблюдается, в таком случае окислительное повреждение ограничивается клеточной стенкой; (2) ФС активно связывается с бактериальной клеткой благодаря электростатическим или вандерваальсовым взаимодействиям, в этом случае в окислительные процессы может быть вовлечена плазматическая мембрана, белки периплазматического пространства; (3) происходит интернализация ФС внутрь клетки благодаря связыванию с клеточной поверхностью с последующей диффузией/активным транспортом и фотосенсибилизированным повреждением внутриклеточных мишеней.

Изучение взаимодействия молекул биоцидов, в том числе антисептиков и фотосенсибилизаторов, 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.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Измерение дзета потенциала

Важнейшей характеристикой физико-химических свойств поверхности бактериальной клетки является поверхностный заряд или дзета-потенциал. Благодаря суммарному отрицательному поверхностному заряду бактериальных клеток [Mozes, 1987], обусловленному наличием фосфатов и карбоксильных групп в составе макромолекул клеточной стенки, электростатические взаимодействия играют значительную роль в процессе взаимодействия с заряженными молекулами различных антимикробных веществ [Wilson, 2001].

Заряженная частица, в том числе бактериальная клетка, в буферном растворе окружена слоем противоионов, который можно разделить на две области: тонкий слой, плотно прилегающий к заряженной поверхности (слой Штерна), который перемещается вместе с частицей в присутствии электрического поля, и более диффузный слой, который мигрирует в противоположном направлении. На границе этих областей находится плоскость скольжения, на которой и измеряется электрокинетический, или дзета потенциал [Pons, 2006].

Для проведения измерения дзета потенциала исследуемые частицы помещаются в кювету, представляющую собой ячейку с электродами. Для каждой частицы характерны два типа движения: случайное Броуновское и под воздействием электрического поля – направленное движение к электродам. Скорость частиц, испытывающих движение под действием электрического поля, определяется по измерению частотного сдвига рассеиваемого ими света [Wilson, 2001]. Одним из компонентов установки для измерения динамического светорассеяния является лазер, служащий источником света. Луч лазера, попадая на делитель, формирует опорный и падающий луч. Формирование опорного луча необходимо для вычисления частотного сдвига. После прохождения через кювету с образцом рассеянный под углом 12.8° пучок света регистрируется детектором. При приложении электрического поля к кювете частицы в анализируемом образце испытывают движение, что вызывает флуктуацию детектируемого света с частотой, пропорциональной скорости движения частицы. Сигнал с детектора поступает на процессор цифровой обработки сигнала и затем на компьютер, где с помощью программного обеспечения производится спектральный анализ и вычисляется электрофоретическая подвижность частиц и на ее основе – дзета потенциал [Malvern Instruments Ltd., 2013].

Фундаментальные законы, лежащие в основе данного метода, описаны в статье [Wilson, 2001]. В отсутствие электрического поля в результате спектрального анализа интенсивности рассеянного света получают спектр частот рассеянного света, который можно описать с помощью функции Лоренца с амплитудой спектра $S(\omega)$ как функции от угловой частоты и характеризующейся параметром Γ , полушириной при значении полувысоты:

$$S(\omega) \propto \frac{\Gamma}{\Gamma^2 + \omega^2} \quad (2.1.1)$$

Параметр Γ , в свою очередь, зависит от движения рассеивающей частицы по закону, который можно определить через коэффициент поступательной диффузии D и вектор рассеяния K :

$$\Gamma = DK^2 \quad (2.1.2)$$

Вектор рассеяния $\vec{K}$ определяется как разность частот волнового вектора опорного луча рассеяния $\vec{k}_0$ и вектора рассеянного под углом θ света $\vec{k}_s$. Амплитуда $\vec{K}$ зависит от длины волны лазера λ_0 и показателя преломления n :

$$|K| = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2} \quad (2.1.3)$$

В результате движения частиц под действием электрического поля, которое определяется направлением и амплитудой вектора скорости движения $\vec{v}_d$, спектр $S(\omega)$ смещается на величину $\Delta\omega = \vec{K} \cdot \vec{v}_d = K v_d \cos \frac{\theta}{2}$ и описывается следующим образом:

$$S(\omega) \propto \frac{\Gamma}{\Gamma^2 + (\omega + \vec{K} \cdot \vec{v}_d)^2} \quad (2.1.4)$$

Из соотношения $\omega = 2\pi\nu$ можно выразить v_d :

$$v_d = \frac{2\pi\Delta\nu}{K \cos \frac{\theta}{2}} \quad (2.1.5)$$

Поскольку v_d прямо пропорциональна напряженности электрического поля E и электрофоретической подвижности μ , то на основе уравнения 2.1.5 μ можно определить следующим образом:

$$\mu = \frac{2\pi\Delta v}{K E \cos \frac{\theta}{2}} \quad (2.1.6)$$

На основе измеренного значения электрофоретической подвижности, известных значений диэлектрической проницаемости вакуума ϵ_0 , диэлектрической проницаемости среды ϵ и вязкости η по уравнению Смолуховского вычисляется характерный для них дзета потенциал [Wilson, 2001]:

$$\zeta = \frac{\eta\mu}{\epsilon\epsilon_0} \quad (2.1.7)$$

О заряде поверхности бактериальных клеток *E. coli* K12 судили по значениям дзета-потенциала, которые измеряли при 25°C с помощью анализатора “Zetasizer Nano ZS” (“Malvern Instruments, Worcestershire”, Великобритания). Непосредственно перед измерениями клетки суспендировали в буфере PBS (pH 7,4), десятикратно разведенном дистиллированной водой PBS/10 (pH 7,4). Показатель мутности суспензий, который измеряли с использованием денситометра “Densimat” (“bioMerieux”, Франция), составлял 1,0 McF. Для приготовления растворов антисептиков в диапазоне 5–50 μM были использованы коммерческие препараты 20 % хлоргексидин диглюконата, 0.05% пиклоксидин дигидрохлорида (Витабакт®), 0.01% мирамистина и 0.1% октенидина (Октенисепт®). Значения дзета потенциала в присутствии антисептиков в различной концентрации измеряли после их инкубации с клетками в течение 5 минут. Все измерения проводили не менее трёх раз.

2.2. Основные принципы метода молекулярной динамики

Метод молекулярной динамики (МД) основан на втором законе Ньютона, на решении классических уравнений движения. Если известна сила, действующая на каждый атом с заданной массой, можно определить ускорение. На основе информации об ускорении, уравнения движения могут быть проинтегрированы, в результате чего получается набор кадров МД расчета, или траектория, содержащая информацию о

положениях, скоростях и ускорениях каждой частицы [Langham, 2010]. Сила F_i , действующая на каждый атом с координатой r_i и массой m_i , определяется из потенциальной энергии системы $U(r^N)$, где $r^N=(r_1 r_2 \dots r_N)$ – набор координат N атомов [Jefferies, 2021]:

$$F_i = -\nabla U(r^N) \quad (2.2.1)$$

Движение атомов моделируется путем численного решения Ньютоновских уравнений движения:

$$\frac{d^2 r_i}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i} \quad (2.2.2)$$

Уравнения движения численно решаются для каждого атома в системе. При перемещении атомов в новые положения на каждом шаге интегрирования вычисляются силы, действующие на них, и расчет продолжается дальше [Langham, 2010]. Дискретизацию дифференциальных уравнений можно осуществить путем разложения в ряды Тейлора, что позволяет описывать поведение молекулярной системы на каждом моменте времени [Zheng, 2018]:

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + v_i(t) \Delta t + \frac{F_i}{2m_i} \Delta t^2 + \frac{\ddot{r}_i(t)}{3!} \Delta t^3 + o(\Delta t^4) \quad (2.2.3)$$

$$v_i(t + \Delta t) = v_i(t) + \frac{F_i}{m_i} \Delta t + \frac{\dot{v}_i(t)}{2} \Delta t^2 + \frac{\ddot{v}_i(t)}{3!} \Delta t^3 + o(\Delta t^4) \quad (2.2.4)$$

Алгоритм Верлета основан на вычислении новых положений атомов в момент времени $t + \Delta t$ с использованием информации о координатах атомов и действующих на них сил ($a = F_i/m_i$) в момент времени t и координатах в момент времени $t - \Delta t$. Таким образом, если представить $r(t + \Delta t)$ и $r(t - \Delta t)$ в виде разложений в ряды Тейлора (2.2.5) и (2.2.6) соответственно и затем их сложить, то можно выразить $r(t + \Delta t)$ в зависимости от $r(t)$ и $r(t - \Delta t)$ (2.2.7). Скорость в момент времени t выражается путем вычитания (2.2.6) из (2.2.5), в результате чего оценивается как (2.2.8). Таким образом, в данном алгоритме вычисление скорости отстает на шаг по сравнению с вычислением положений частиц [Hug, 2013].

$$r(t + \Delta t) = r(t) + v(t)\Delta t + \frac{a}{2}\Delta t^2 + \frac{\ddot{r}_i(t)}{3!}\Delta t^3 + o(\Delta t^4) \quad (2.2.5)$$

$$r(t - \Delta t) = r(t) - v(t)\Delta t + \frac{a}{2}\Delta t^2 - \frac{\ddot{r}_i(t)}{3!}\Delta t^3 + o(\Delta t^4) \quad (2.2.6)$$

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) + a\Delta t^2 - r(t - \Delta t) + o(\Delta t^4) \quad (2.2.7)$$

$$v(t) = \frac{r(t + \Delta t) - r(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad (2.2.8)$$

Модификацией алгоритма Верлета является leap-frog, в котором для вычисления обновленных значений координат и скоростей используется информация о положениях частиц в момент времени $(t + \Delta t)$ и скоростях в момент времени $(t + \frac{1}{2}\Delta t)$:

$$v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + a\Delta t \quad (2.2.9)$$

$$r(t + \Delta t) = r(t) + v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right)\Delta t \quad (2.2.10)$$

Алгоритм получил свое название благодаря тому, что скорость перепрыгивает через координату для получения значения на следующем полушаге, которое используется для вычисления новых положений частиц. Скорость на конкретном целом шаге вычисляется как полусумма скоростей, вычисленных на полушагах (2.2.11). Преимуществом данного алгоритма является то, что скорость вычисляется явным образом [Hug, 2013].

$$v(t) = \frac{1}{2} \left(v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) + v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) \right) \quad (2.2.11)$$

Начальные координаты молекул, как правило, основаны на структурах, полученных с помощью экспериментальных методов рентгеноструктурного анализа, ядерно-магнитного резонанса, криоэлектронной микроскопии, а также с помощью методов компьютерного моделирования, например, моделирования по гомологии. Начальные скорости атомов оцениваются из распределения скоростей Максвелла-Больцмана [Jefferies, 2021]:

$$P(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi kT}} e^{-\frac{m_i v_i^2}{2k_B T}} \quad (2.2.12)$$

Поскольку при МД расчете исследуются свойства относительно маленьких молекулярных систем, крайне важным является корректный учет граничных условий. По мере того как исследуемая молекула замещает конформационное пространство в течение МД расчета, возникают моменты, когда молекула подходит близко к границам реакционной ячейки и сталкивается с вакуумом [Jefferies, 2021]. Чтобы избежать нефизических краевых эффектов, накладываются периодические граничные условия: реакционная ячейка окружается своими бесконечными копиями посредством параллельного переноса. Каждая частица взаимодействует со своими непосредственными соседями, включая атомы периодических образов. В ходе расчета частицы могут беспрепятственно пересекать границы реакционной ячейки. В том случае, когда это происходит, частица заменяется своим периодическим образом, который входит в ячейку с противоположной стороны реакционной ячейки. Таким образом, количество атомов в реакционной ячейке остается постоянным [Leach, 2001].

При прямом интегрировании Ньютоновских уравнений движения расчет проводится в микроканоническом ансамбле, в котором постоянными остаются количество частиц N , объем V и полная энергия E . Поскольку экспериментальные данные получают при определенной температуре и давлении, были созданы специальные алгоритмы, позволяющие проводить МД расчеты в каноническом ансамбле (NVT), в котором общая энергия может меняться с целью поддержания постоянной температуры, или изотермально-изобарном ансамбле (NPT), в котором поддерживаются постоянными температура и давление. Алгоритм для поддержания постоянного значения температуры называется термостатом, для поддержания постоянного значения давления – баростатом [Hug, 2013]. Наиболее популярными являются термостаты Берендсена, Нозе-Хувера, V-rescale. Среди баростатов часто используются баростат Берендсена и Парринелло-Рамана [Jefferies, 2021].

Потенциальная энергия системы определяется как сумма термов валентных $U_{\text{ВВ}}$ и невалентных взаимодействий, к которым относятся энергия электростатических $U_{\text{ЭЛ}}$ и ван-дер-ваальсовых взаимодействий $U_{\text{ЛЖ}}$, описываемых потенциалами Леннарда-Джонса [Jefferies, 2021; Langham, 2010; Monticelli, 2013; Zheng, 2018]:

$$U(r^N) = U_{\text{ВВ}} + U_{\text{ЭЛ}} + U_{\text{ЛЖ}} \quad (2.2.13)$$

Энергия валентных взаимодействий $U_{\text{ВВ}}$ определяется суммой термов, описывающих колебания связей, валентных углов, правильных и неправильных двугранных углов (2.2.14). Термы связей и валентных углов описываются гармоническими потенциалами, которые аппроксимируются как функции отклонения от равновесных значений связей r_0 и углов θ_0 с силовыми константами k_{ij}^r и k_{ijk}^θ для пар i,j и троек i,j,k атомов соответственно. Энергия вращения вокруг связей описывается торсионными потенциалами правильных двугранных углов в виде функции косинуса с силовой константой k_{ijkl}^φ , мультиплетностью m и фазой γ_m . Для некоторых химических групп ключевым свойством является их планарность, например, атомы пептидной связи или ароматического кольца находятся в одной плоскости. Для того чтобы в течение МД расчета эти фрагменты сохраняли плоскую структуру используют неправильные двугранные углы с силовыми константами k_{ijkl}^ω и внеплоскостным углом $\omega_{ijkl} - \omega_0$ [Jefferies, 2021; Monticelli, 2013].

$$\begin{aligned}
 U_{\text{ВВ}} = & \frac{1}{2} \sum_{\text{связи}} k_{ij}^r (r_{ij} - r_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{вал.углы}} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_0)^2 + \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{\text{прав.дв.углы}} k_{ijkl}^\varphi (1 + \cos(m \varphi_{ijkl} - \gamma_m))^2 + \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{\text{неправ.дв.углы}} k_{ijkl}^\omega (\omega_{ijkl} - \omega_0)^2
 \end{aligned} \tag{2.2.14}$$

Для описания взаимодействий между частицами, разделенными тремя и более связями, и между атомами в разных молекулах используют потенциалы Леннарда-Джонса (2.3.15). Параметрами таких взаимодействий являются σ – расстояние, на котором потенциал равен нулю, и ε – глубина потенциальной ямы. Компонент потенциала r^{-6} соответствует притяжению между наведенными диполями, r^{-12} – отталкиванию на близких расстояниях [Jefferies, 2021].

$$U_{\text{ЛЖ}} = \sum_{\text{несвязанные пары}} 4\varepsilon_{ij} \left(\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right) \tag{2.2.15}$$

$U_{\text{ЭЛ}}$ между двумя заряженными частицами i и j , обладающими точечными зарядами q_i и q_j и находящимися на расстоянии r_{ij} в среде с диэлектрической постоянной ε , описывается Кулоновским потенциалом:

$$U_{\text{эл}} = \sum_{\text{несвязанные пары}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}} \quad (2.2.16)$$

Поскольку вычисление невалентных взаимодействий между всеми атомами является трудоемким процессом, взаимодействия между атомами, находящимися дальше определённого расстояния (радиуса обрезания), не учитываются [Langham, 2010].

2.3. Крупнозернистое силовое поле Martini для исследования биологических систем методом молекулярной динамики

2.3.1. Устройство силового поля Martini

Использование полноатомной МД имеет ограничения, связанные с размером молекулярной системы и временем ее исследования. Для преодоления этих ограничений были разработаны КЗ подходы, в которых вместо атомов рассматриваются частицы, представляющие собой группы атомов. Одним из наиболее популярных КЗ силовых полей является Martini, изначально разработанное в 2003 г. для исследования свойств липидных мембран [Bruininks, 2019]. Название данное силовое поле получило в 2007 г. одновременно с выходом его второй версии и оригинальной статьи [Marrink, 2007] в честь прозвища города Гронинген (Нидерланды), в котором оно было разработано. Название также совпадает с названием популярного коктейля и отражает базовую идею подхода: несколько простых ингредиентов, химических структурных фрагментов, можно варьировать для создания разнообразной палитры вкусов/описания различных веществ [Periole, 2013]. Таким образом, идея данного похода была в создании универсального силового поля, которое описывало бы свойства широкого ряда молекул без необходимости репараметризации моделей. КЗ частицы, соответствующие определенным химическим фрагментам, были введены в силовое поле Martini на основе их калибровки относительно термодинамических экспериментальных данных, в частности, коэффициентов распределения вещества в системе вода/масло [Periole, 2013]. В настоящее время данное силовое поле активно применяется для исследования широкого ряда биомолекул, включая белки, сахара, ЛПС, нуклеотиды, кофакторы, наночастицы, синтетические полимеры, антимикробные пептиды [Bruininks, 2019].

Martini модель основана на том принципе, что полноатомная структура разбивается на химические фрагменты в три-четыре тяжелых атома, например, карбоксильные, пептидные или алифатические группы. Поскольку базовыми концепциями были простота и универсальность силового поля, в Martini существуют всего четыре основных типа КЗ

частиц: заряженные (Q), полярные (P), неполярные (N), аполлярные (C). Внутри основных типов выделяют подтипы, таким образом, общее количество разных типов КЗ частиц составляет 18. Для типов частиц Q и N существуют подтипы, основанные на их способности к образованию водородной связи и их роли в этом процессе: d (донор), a (акцептор), da (донор и акцептор), 0 (не участвует). Для двух других типов, P и C, существуют по пять подтипов, индексированных от 1 до 5 в зависимости от свойств полярности/аполлярности [Bruininks, 2019; Marrink, 2007; Periole, 2013]. Примеры структурных химических фрагментов, описываемых конкретными типами КЗ частиц, представлены в таблице 2.3.1.1, модифицированной из оригинальной статьи [Marrink, 2007].

Таблица 2.3.1.1 – Соответствие типов КЗ частиц определенным химическим фрагментам

Тип частицы	Структурный фрагмент	Примеры
Qad	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{C}_2-\text{OH}$	Этаноламин
Qd	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{C}_3$	1-пропиламин
Qa	PO_4^-	Фосфат
Q0	C_3N^+	Холин
P1	C_3-OH	1-пропанол, 2-пропанол
P2	C_2-OH	Этанол
P3	$\text{HO}-\text{C}_2=\text{O}$, $\text{C}-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$	уксусная кислота, метилформамид
P4	HOH (x4), $\text{HO}-\text{C}_2-\text{OH}$	вода, этандиол
P5	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_2=\text{O}$	Ацетамид
Nda	C_4-OH	1-бутанол
Nd	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_3$	1-пропиламин
Na	$\text{C}_3=\text{O}$, $\text{C}-\text{NO}_2$, $\text{C}-\text{O}-\text{C}=\text{O}$, $\text{C}_2\text{HC}=\text{O}$	2-пропанон, нитрометан, метилформиат, пропаналь
N0	$\text{C}-\text{O}-\text{C}_2$	Метоксиэтан
C1	C_4	бутан, изопропан
C2	C_3	Пропан
C3	$\text{C}_2=\text{C}_2$, C_3-X	2-бутен, 1-хорпропан, 1-бромпропан
C4	$\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}$, $\text{C}-\text{X}_4$	1,3-бутадиен, хлороформ
C5	C_3-SH , $\text{C}-\text{S}-\text{C}_2$	пропантиол, метилэтилсульфид

Масса каждой стандартной КЗ частицы в силовом поле Martini составляет 72 а.е., что соответствует стандартной модели воды, которая объединяет четыре молекулы воды в одну КЗ частицу типа P4. Для описания кольцевых фрагментов используются КЗ частицы с меньшей массой, равной 45 а.е. В силовом поле такие частицы называются с префиксом S, например, SP1 [Marrink, 2007].

Параметризация валентных взаимодействий осуществляется на основе полноатомных МД расчетов. Для описания невалентных взаимодействий используют 12-6

потенциалы Леннарда-Джонса и кулоновские потенциалы. Для повышения эффективности расчетов потенциалы смещаются к нулю на расстояниях, превышающих радиус обрезания, равный 1.1 нм. Для параметризации КЗ частиц были рассчитаны термодинамические характеристики, включая свободные энергии гидратации и распределения между водной фазой и органическими растворителями. На основе чего для описания ван-дер-ваальсовых взаимодействий между разными типами частиц были введены параметры σ и $\epsilon_{\text{ЛЖ}}$, характеризующие эффективный размер частицы и глубину потенциальной ямы. Для стандартных типов КЗ частиц характерно значение $\sigma=0.47$ нм, параметр $\epsilon_{\text{ЛЖ}}$ варьирует в зависимости от типа взаимодействия между определенными типами КЗ частиц (таблица 2.3.1.2). Исключение составляют взаимодействия между заряженными частицами типа Q и самыми аполярными частицами типов C1 и C2, для которых для $\sigma=0.62$ нм. Для S-частиц также характерны меньшие значения σ и $\epsilon_{\text{ЛЖ}}$, равные 0.43 нм и 0.75 % от $\epsilon_{\text{ЛЖ}}$ [Marrink, 2007].

Таблица 2.3.1.2 – Типы невалентных взаимодействий в силовом поле Martini версии 2.P.

Тип взаимодействия	σ , нм	$\epsilon_{\text{ЛЖ}}$, кДж/моль
O, сверхпритягивающий	0.47	5.6
I, притягивающий	0.47	5.0
II, почти притягивающий	0.47	4.5
III, полупритягивающий	0.47	4.0
IV, промежуточный	0.47	3.5
V, почти промежуточный	0.47	3.1
VI, полуотталкивающий	0.47	2.7
VII, почти отталкивающий	0.47	2.3
VIII, отталкивающий	0.47	2.0
IX	0.62	2.0

Упрощенная стандартная модель воды в Martini не несет заряда, поэтому в ней не учитываются свойства воды как полярного растворителя. Данная проблема была решена путем создания модели поляризуемой воды, обладающей свойствами ориентационной поляризуемости. Модель поляризуемой воды состоит из трех частиц: центральной нейтральной W и двух дополнительных WP и WM, несущих заряды +0.46/-0.46. Для W частицы характерны ван-дер-ваальсовы взаимодействия с другими частицами, для WP и WM – кулоновские. На длину связей между WP/WM и W частицами наложены ограничения 0.14 нм. Взаимодействия между WP и WM частицами внутри одной частицы воды исключаются. Равновесное значение валентного угла между частицами составляет 0, силовая константа k_{ijk}^{θ} – кДж/моль·рад². Масса каждой из трех частиц составляет 24 а.е. Параметры ван-дер-ваальсовых взаимодействий составляют $\sigma=0.47$ нм, $\epsilon_{\text{ЛЖ}} = 4$ кДж/моль.

Параметризация модели осуществлялась таким образом, чтобы значения диэлектрической постоянной и плотности частицы были близки к таковым для реальных значений, характерных для воды, и чтобы свободные энергии распределения КЗ частиц между водой и органическими растворителями остались неизменными [Yesylevskyu, 2010].

2.3.2. Методика создания крупнозернистых молекулярных моделей антимикробных соединений

Данный раздел написан с использованием материалов статьи [Orekhov, 2018]. Трехмерные полноатомные структуры антимикробных соединений были построены в молекулярном редакторе *Rymol* на основе известной химической структуры с последующей оптимизацией геометрии молекул с применением базисов SBKJC, затем 6-31+G**. Квантово-химические расчеты были выполнены с помощью программного пакета Firefly [Granovsky,]. Топологии для полноатомных моделей антимикробных соединений были получены с использованием онлайн сервиса Automated Topology Builder (ATB) [Malde, 2011] в силовом поле GROMOS54A7 [Schmid, 2011] на основе оптимизированных с помощью квантово-химических расчетов структур. Для каждой молекулы были проведены расчеты полноатомной МД. Одиночная молекула антимикробного соединения помещалась в расчетную ячейку с добавлением Na^+/Cl^- ионов в концентрации 150 мМ и суммарным нейтральным зарядом системы. Полноатомный МД расчет для каждой модели проводился в течение 200 нс с использованием программного пакета Gromacs 2019.4 [Abraham, 2015]. Температура (310 К) и давление (1 бар) поддерживались постоянными с использованием термостата Нозе-Хувера и баростата Паринелло-Рамана. Полноатомные МД расчеты проводились с шагом интегрирования 2 фс.

“На основе вспомогательных полноатомных моделей антимикробных соединений были созданы их КЗ модели в рамках силового поля Martini. Разбиение полноатомной структуры молекул на КЗ фрагменты проводились по аналогии с уже существующими моделями и в соответствии с базовой концепцией Martini: (1) КЗ частица состоит в среднем из 4 тяжелых атомов (2) КЗ частицы должны объединять специфические химические группы, 3) в топологии должна учитываться симметрия молекулы, 4) кольцевые молекулы должны состоять по крайней мере из трех крупно-зернистых частиц, (5) КГ частицы из двух-трех тяжелых атомов должны описываться особыми S-частицами с меньшей молекулярной массой.

Параметры валентных взаимодействий для КЗ моделей были итеративно оптимизированы на основе проведенных полноатомных МД расчетов следующим

образом: гистограммы распределения для углов и связей, полученные из серии коротких КЗ МД расчетов (10 нс), на каждом шаге итерации сравнивались с гистограммами распределений из полноатомного расчета. Центр и высота пика гистограммы соответствуют равновесным значениям длины связи/угла и константе жесткости. Равновесные значения длин связей и углов были вычислены по формулам (2.3.1) и (2.3.2), в которых $l^{ПА}$ $\theta^{ПА}$ соответствовали центрам гистограмм распределения, полученным из полноатомного МД расчета, $l^{КЗ}$ и $\theta^{КЗ}$ – из КЗ расчета на конкретном шаге итерации. Значения констант жесткости для связей и углов были вычислены в соответствии с формулой (2.3.3). $A^{ПА}$ и $A^{КЗ}$ соответствовали амплитудам гистограмм распределения на конкретном шаге итерации для полноатомного и КЗ расчета соответственно. ” [Orekhov, 2018].

$$l_o^i = l_o^{i-1} + 0.5(l^{ПА} - l^{КЗ}) \quad (2.3.1)$$

$$\theta_o^i = \theta_o^{i-1} + 0.5(\theta^{ПА} - \theta^{КЗ}) \quad (2.3.2)$$

$$k^i = k^{i-1} \left(\frac{A^{ПА}}{A^{КЗ}} \right) \quad (2.3.3)$$

2.3.3. Детали реализации крупнозернистых молекулярно-динамических расчетов

КЗ МД расчеты были проведены с использованием GROMACS 2019.4 [Abraham, 2015]. Каждому продуктивному расчету МД предшествовала минимизация по алгоритму наименьшего спуска. Параметры моделирования были выбраны в соответствии с рекомендациями, представленными в работе [DeJong, 2016]. КЗ МД расчеты проводилось в ансамбле NPT при температуре 320 К с использованием термостата V-rescale ($T = 320$ К, $\tau_t = 1,0$ пс) и в случае расчетов систем, содержащих мембраны, семи-изотропного баростата Паринелло-Рамана ($p_{ref} = 1$ бар, $\tau_p = 12$ пс). Все КЗ расчеты выполнены с использованием модели поляризуемой воды ($\epsilon_r = 2,5$) [Yesylevsky, 2010] и reaction-field подхода для расчетов электростатических взаимодействий с шагом интегрирования 20 фс.

Характеристики модельных бислоев были вычислены с использованием встроенных утилит программного пакета Gromacs 2019.4 (площадь на липид - *gmx energy*, коэффициенты латеральной диффузии - *gmx msd*) и с помощью программ, написанных на языке Python, с применением функций библиотеки MDAnalysis (профили плотности, профили локальной толщины, радиальные функции распределения, оценка количества липидов вне плоскости бислоя, параметры порядка жирнокислотных и антигенных цепей).

Характеристики модельных бислоев для каждой системы были посчитаны по двум последним мкс МД расчета.

2.4. Метод зонтичной выборки

Метод зонтичной выборки, разработанный авторами Torrie и Valleau [Torrie, 1977], относится к методам неравновесной МД и позволяет замести конформационное пространство вдоль выбранной координаты реакции ξ , исходя из чего можно оценить значение относительной свободной энергии системы в разных состояниях вдоль координаты реакции [Zheng, 2018]. Схематично идею метода можно описать следующим образом. Если для системы известны два термодинамических состояния А и Б, то можно выделить путь, или координату реакции, по которому можно попасть из состояния А в состояние Б. Этот путь можно разбить на окна, покрывающие малые участки вдоль координаты реакции. В каждом окне можно добиться того, что система заметет конформационное пространство. При комбинировании выборок из разных окон можно получить профиль свободной энергии [Kastner, 2011].

Если в реальной задаче для системы известны два состояния и выбрана координата реакции, то можно оценить путь, по которому система попадает из одного состояния в другое, путем прикладывания к ней потенциала, постепенно смещающего систему. Затем вдоль этой координаты реакции выбираются N окон, в каждом из которых на систему накладывается дополнительный потенциал, удерживающий ее в пределах этого окна. При добавлении к системе в каждом окне дополнительного гармонического потенциала $\omega_i(\xi)$ (2.4.1), зависящего только от координаты реакции, общая энергия смещенной системы (E_b) выражается как сумма добавленного потенциала и энергии несмещенной системы (E_u) (2.4.2) [Kastner, 2011].

$$\omega_i(\xi) = \frac{1}{2} K (\xi - \xi_i)^2 \quad (2.4.1)$$

$$E_b = E_u + \omega_i(\xi) \quad (2.4.2)$$

На основе полученного из МД расчетов с дополнительным потенциалом смещенного распределения системы вдоль координаты реакции $P_i^b(\xi)$ и известного $\omega_i(\xi)$ можно вычислить относительную свободную энергию $A_i(\xi)$ с использованием выражения (2.4.3). В представленном уравнении F_i , независимая от ξ , выражается как $F_i = -(1/\beta) \ln \langle e^{-\beta \omega_i(\xi)} \rangle$, $\beta = 1/k_B T$ [Kastner, 2011].

$$A_i(\xi) = -\frac{1}{\beta} P_i^b(\xi) - \omega_i(\xi) + F_i \quad (2.4.3)$$

При комбинировании зависимостей $A_i(\xi)$ для всех окон в одну глобальную $A(\xi)$ можно оценить профиль свободной энергии вдоль выбранной координаты реакции на основе проведенных расчетов зонтичной выборки. Одним из популярных подходов для этой цели является метод взвешенных гистограмм, разработанный и описанный в работе [Kumar, 1992].

Детали молекулярно-динамических расчетов зонтичной выборки

Данный раздел написан с использованием материалов статьи [Orekhov, 2018]. “Профили свободной энергии для оценки сродства ZnPc^{8+} к модельным мембранам были оценены на основе проведения расчетов зонтичной выборки. На первом этапе для каждой мембраны в присутствии ZnPc^{8+} был проведен МД расчет, в котором центр масс ZnPc^{8+} смещался из водного раствора к центру гидрофобной области мембраны с постоянной скоростью 0.01 нм/нс и силовой константой 10000 кДж/моль·нм². На следующем этапе на основе такой траектории для каждой системы были выбраны начальные конфигурации зонтичной выборки (окна). В качестве координаты реакции ξ было выбрано расстояние между ZnPc^{8+} и центром бисюля. Для системы ЛПС // DPPE значение ξ изменялось от 7 до 0 нм, для POPE:POPG и POPC – от 6 до 0 нм с шагом в 0.2 нм. Для каждого окна зонтичной выборки был проведен МД расчет в течение 400 нс, в котором центр масс молекулы ZnPc^{8+} удерживался в центре окна зонтичной выборки путем прикладывания гармонического потенциала с силовой константой 1000 кДж/моль·нм². На основе последних 200 нс проведенных расчетов для окон зонтичной выборки были получены профили свободной энергии методом взвешенных гистограмм с использованием встроенной утилиты программного пакета Gromacs [Hub, 2010].”

2.5. Основные принципы метода броуновской динамики

Метод броуновской динамики (БД) основан на решении уравнения Ланжевена [Langevin, 1908], в котором движение частицы происходит под действием внешней электростатической $F(r)$ силы и случайной $f(t)$ силы, учитывающей тепловое движение.

Сила трения, определяемая через вычисляемый коэффициент вязкого трения $\xi_{\text{тр}}$, так же, как и случайная сила, позволяет учесть взаимодействие с растворителем. Уравнения Ланжевена для поступательного движения описывается формулой (2.5-1):

$$m\ddot{r} = -\xi_{\text{тр}}\dot{r} + F(r) + f(t) \quad (2.5-1)$$

При исследовании диффузии рассматриваемых как твердые тела макромолекул в растворе пренебрегают быстрой динамикой системы, и, как следствие, инерциальным членом $m\ddot{r}$. Поэтому описание поступательного броуновского движения сводится к решению следующего уравнения:

$$\xi_{\text{тр}}\dot{r} = F(r) + f(t) \quad (2.5-2)$$

Уравнения Ланжевена для вращательного движения описывается формулой (2.5-3), где α – угол поворота относительно рассматриваемой оси, $m(t)$ момент случайной, $M(r)$ – электростатической силы:

$$\xi_{\text{вр}}\dot{\alpha} = m(t) + M(r) \quad (2.5-3)$$

В данных моделях молекулы рассматриваются как твердые тела, совершающие диффузионное поступательное и вращательное движение. Шаг по времени выбирается в пикосекундном диапазоне (10-100 пс).

Для учета гидродинамических взаимодействий макромолекул с неявным растворителем, представленным непрерывной средой с вязким трением, вычисляются коэффициенты трения. Поскольку эта задача является нетривиальной для описания движения макромолекул произвольной формы, известная трехмерная структура макромолекулы аппроксимируется эллипсоидом вращения, для которого коэффициенты трения для поступательного и вращательного движений вычисляются по формулам Перрена [Perrin, 1936].

Для учета электростатических взаимодействий используют уравнение Пуассона-Больцмана, позволяющее учесть диэлектрическую поляризуемость среды и экранирование зарядов на макромолекуле за счет перераспределения ионов вокруг заряженных областей. В данном уравнении $\nabla\varphi$ – электростатический потенциал, ε_0 – электрическая постоянная, $\varepsilon(r)$ – диэлектрическая проницаемость среды, ρ – объемная плотность фиксированных зарядов макромолекулы, c_i^∞ – концентрация подвижных зарядов, или ионов, в отсутствие электрического поля, z_i и q_p – заряды иона и протона соответственно [Коваленко, 2016; Хрущёв, 2013]:

$$\varepsilon_0 \nabla[\varepsilon(r) \nabla \varphi(r)] = -\rho - \sum_i c_i^\infty z_i q_p e^{-\frac{z_i q_p \varphi(r)}{kT}} \quad (2.5-4)$$

Процесс взаимодействия молекул в данном подходе можно разделить на (1) свободную диффузию на дальних расстояниях и (2) формирование диффузионно-столкновительных комплексов при сближении макромолекул на достаточное расстояние в результате их взаимной ориентации под действием электростатических сил. Критерием образования таких макромолекулярных комплексов является достижение порогового значения энергии их электростатического взаимодействия. Результатом проведения серии БД расчетов является ансамбль диффузионно-столкновительных структур, позволяющий выявить характерные взаимные положения молекул в макромолекулярном комплексе [Коваленко, 2016; Хрущёв, 2013].

Детали проведения и анализа расчетов броуновской динамики

Моделирование процесса броуновской диффузии молекул ФС и их электростатического взаимодействия со спайковыми белками коронавирусов было проведено с использованием разработанного на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова программного обеспечения “ProKSim” (Protein Kinetics Simulator) [Хрущёв, 2013]. В данном подходе белок рассматривался как область с диэлектрической проницаемостью $\varepsilon = 2$ с фиксированными в пространстве парциальными зарядами. Парциальные заряды S-белков были выбраны в соответствии с силовым полем CHARMM27. Электростатическое поле молекул было вычислено с использованием формализма Пуассона-Больцмана. Растворитель учитывался неявно ($\varepsilon = 80$). Энергия электростатического взаимодействия молекул учитывалась на расстояниях менее 3,5 нм. Расчеты были проведены при ионной силе 100 мМ.

S-белок помещался в реакционную ячейку размером 30х30х30 нм с зеркальными граничными условиями таким образом, что за пределами реакционного объема находились ТМ и СР домены. В каждом вычислительном эксперименте молекула ФС помещалась в реакционный объем в произвольном положении. БД расчет продолжался до тех пор, пока энергия электростатического притяжения не достигала заданного порогового значения. Полученная структура диффузионно-столкновительного комплекса сохранялась для дальнейшего анализа. Для каждого типа расчета, подразумевавшего взаимодействие ФС со спайковым белком при заданном пороге энергии электростатического взаимодействия, проводили 20 тысяч независимых БД расчетов. Для

анализа полученных ансамблей структур был использован однопараметрический иерархический кластерный анализ. Кластером структур считалась плотная группа, отделенная от соседних групп менее плотными областями. Для каждого кластера была определена центральная структура, которая характеризуется минимальным среднеквадратическим расстоянием от других структур кластера. Контакты по всему ансамблю структур между ФС и отдельными аминокислотными остатками спайковых белков были оценены с помощью программы, написанной нами на языке Python, в которой учитывались и подсчитывались аминокислотные остатки спайкового белка, которые расположены в пределах 5 Å от молекулы ФС. Вероятность контакта с ФС для каждой аминокислоты была рассчитана как средняя доля контактов по всему ансамблю структур. Вероятности контактов индивидуальных аминокислотных остатков были визуализированы на поверхности S-белков градиентом цвета данного аминокислотного остатка (от оранжевого к красному по мере возрастания вероятности контакта), а также на первичных аминокислотных последовательностях.

Создание трехмерных моделей S-белков коронавируса

Структурная модель белка S-белка SARS-CoV-2 была адаптирована из работы [Woo, 2020]. Модели спайковых белков коронавируса SARS-CoV и MERS были созданы на основе структур, полученных с помощью криоэлектронной микроскопии (PDB ID: 6NB3 и 5X58 соответственно). Неразрешенные аминокислотные остатки «голов» S-белков были достроены с помощью онлайн-сервиса i-TASSER [Zhang, 2008a]. «Ноги» S-белков, содержащие домены HR2, CP и TM (1223–1353 для MERS и 1105–1255 для SARS-CoV), отсутствовали в исходных трехмерных структурах. Их вторичная структура была предсказана на основе последовательностей UniProt A0A140AYW5 для MERS и P59594 для SARS-CoV с использованием сервера Jpred4 [Drozdetskiy, 2015]. Затем на основе предсказанной вторичной структуры были созданы трехмерные структуры «ног» S-белков с использованием программного обеспечения Modeller 9.19 [Webb, 2016]. В качестве шаблона для укладки элементов вторичной структуры была взята кристаллическая структуры суперспирали (PDB ID: 2WPQ), как это было ранее сделано в работе [Casalino, 2020].

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Изучение взаимодействия катионных антисептиков с бактериальными мембранами различного состава

3.1.1. Создание молекулярных моделей катионных антисептиков

Данный раздел написан с использованием материалов статьи [Kholina, 2020]. Для получения детальной картины о природе молекулярных механизмов действия катионных антисептиков были построены их КЗ модели на основе полноатомных молекулярных моделей согласно процедуре, описанной в разделе 2.3.2. В качестве модельных объектов были выбраны представители разных химических классов катионных антисептиков: бигуанидов (CHL, PIC) и ЧАС (MIR, OCT). Химические структуры антисептиков с разбиением их на КЗ частицы представлены на рисунке 3.1.1.1.

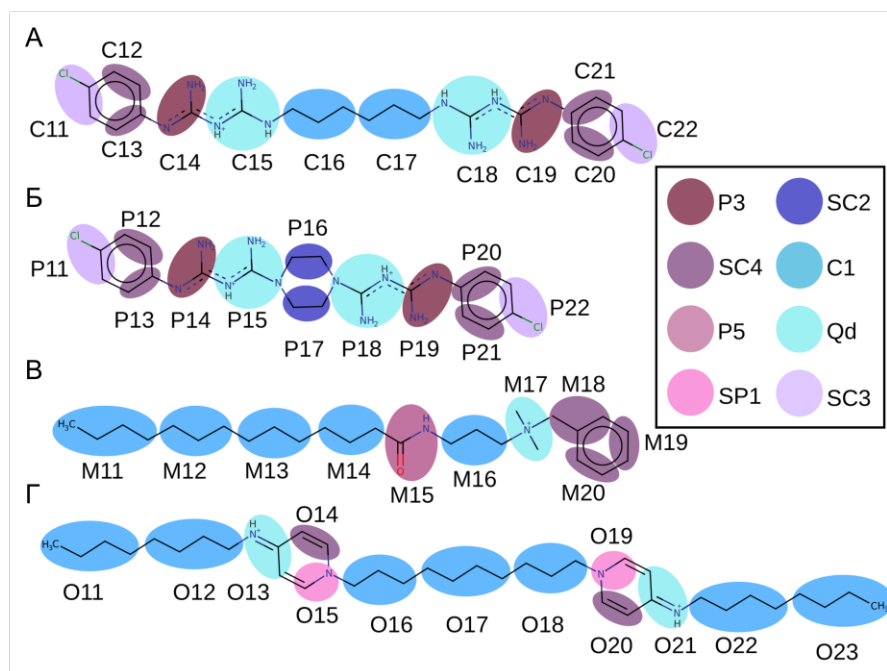


Рисунок 3.1.1.1 – Структурные формулы катионных антисептиков с разбиением на структурные фрагменты, соответствующие отдельным КЗ частицам. Рядом с КЗ частицами указаны их названия в соответствии с топологией, типы частиц в силовом поле Martini показаны разными цветами, что отражено в легенде. (А) CHL; (Б) PIC, (В) MIR, (Г) OCT

Разбиение молекул на отдельные частицы было выполнено с учетом рекомендаций, описанных в разделе 2.3.2, и по аналогии с существующими моделями аминокислот и липидов. С1 тип частиц был выбран для описания гидрофобных участков катионных антисептиков по аналогии с параметризацией липидов; SC2/SC3/SC4 – для описания ароматических фрагментов, по аналогии с ароматическими аминокислотами; P5 – для фрагментов, содержащих пептидные связи, по аналогии с параметризацией аминокислот во второй версии силового поля Martini.

Полученные распределения валентных термов вместе с равновесными значениями углов и связей на примере молекулы MIR показаны на рисунке 3.1.1.2. Детали полученных КЗ моделей катионных антисептиков, а именно: заряд молекулы, количество частиц/связей/валентных углов представлены в таблице 3.1.1.1.

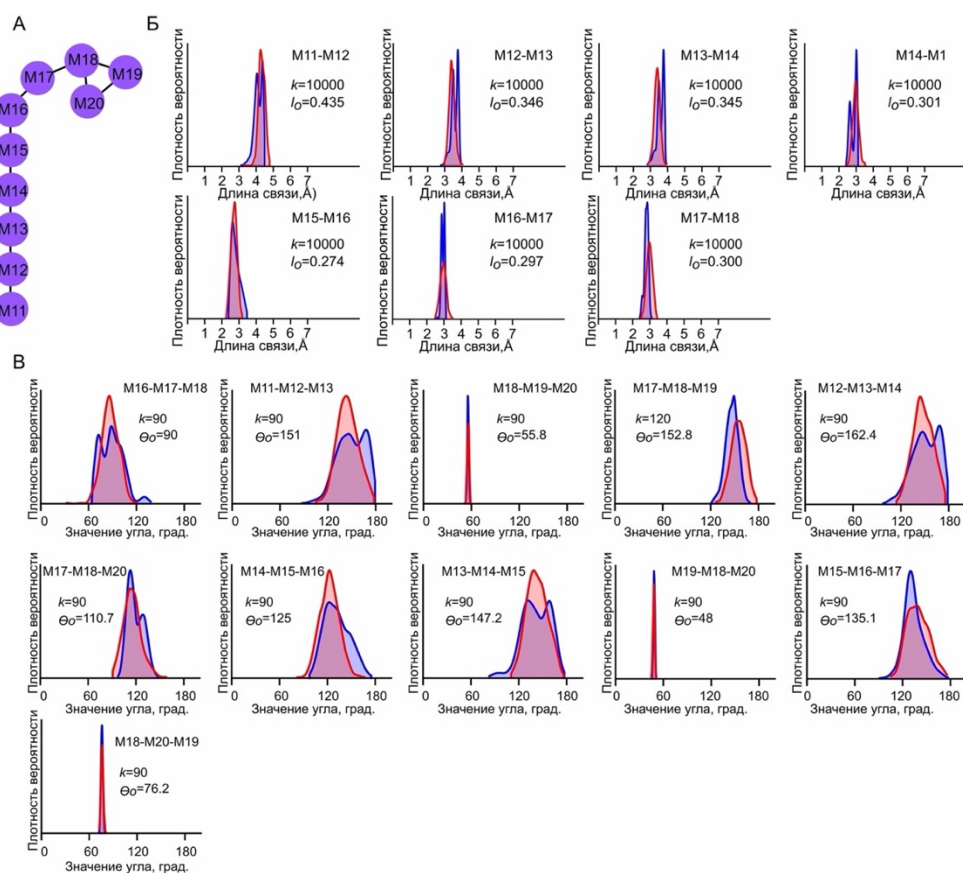


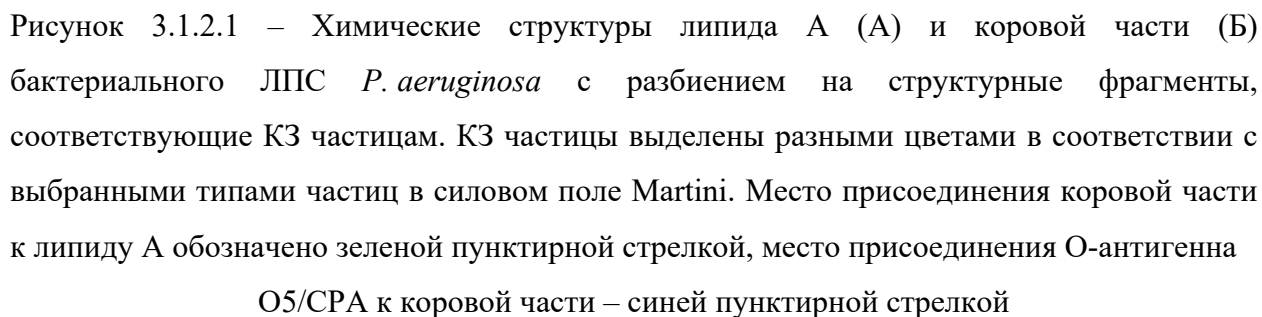
Рисунок 3.1.1.2 – Параметризация валентных параметров катионных антисептиков на примере MIR. (А) Схематическое изображение КЗ структуры MIR, названия частиц в соответствии с топологией. Распределения для связей (Б) и валентных углов (В) между КЗ частицами. Распределения, полученные на основе анализа полноатомного МД расчета, показаны синим, на основе КЗ – красным. Для каждого параметра приведены константы жесткости k (для связей в кДж/моль·нм², для углов в кДж/моль·рад²), а также равновесные значения длин связей l_o и валентных углов θ_o .

Таблица 3.1.1.1 – Детали КЗ моделей катионных антисептиков

Название антисептика	Заряд молекулы	Количество частиц	Количество связей	Количество валентных углов
CHL	+2	12	13	16
PIC	+2	12	14	20
MIR	+1	10	10	11
OCT	+2	13	14	19

3.1.2. Создание молекулярных моделей липополисахаридных мембран *P. aeruginosa* с О-антигенными цепями серотипа О5 и общими полисахаридными антигенами

Для создания КЗ моделей ЛПС были созданы вспомогательные полноатомные молекулярные модели наружной ЛПС мембраны *P. aeruginosa* PAO1 с двумя вариантами антигенных цепей: О-антигенной цепью типа О5 и с СРА. В составе каждой мембраны было 50 молекул ЛПС, 49 из которых были представлены молекулами шероховатых ЛПС без антигенных цепей и одна – гладкой молекулой ЛПС с О-антигенной цепью типа О5 /СРА. О-антигенная цепь типа О5/СРА в созданных моделях состояли из пяти повторяющихся фрагментов. У клеток лабораторных штаммов и клинических штаммов, выделенные из пациентов с бронхоэктазией, с кровяными и глазными инфекциями, 75% молекул липида А обладают пентаацильной формой липида А [King, 2009; Knirel, 2006], что было учтено при выборе типа химической структуры липида А в составе ЛПС. Коровая часть ЛПС молекул была представлена гликоформой II и модифицирована остатками фосфоэтаноламина. Начальные структуры полноатомных мембран были созданы с помощью онлайн-сервиса CHARMM-GUI *Membrane Builder* [Lee, 2019], который позволяет создавать полноатомные ЛПС-содержащие модели различного состава в рамках силового поля Charmm36. Отрицательные заряды липида А и коровой части были компенсированы катионами Ca^{2+} , также в расчетные ячейки были добавлены ионы Na^+/Cl^- в концентрации 150 мМ. Всего в модельная ЛПС система с СРА состояла из 119911 атомов с 31879 молекулами воды, а модельная ЛПС система с О-антигеном О5 состояла из 131571 атомов с 35706 молекулами воды типа TIP3P. Длина полноатомных МД расчётов для каждой системы составила около 1,2 мкс. Полноатомные модели мембран были использованы для создания КЗ моделей одиночных молекул ЛПС с О-антигенной цепью типа О5 /СРА. Химические структуры липида А и коровой части,



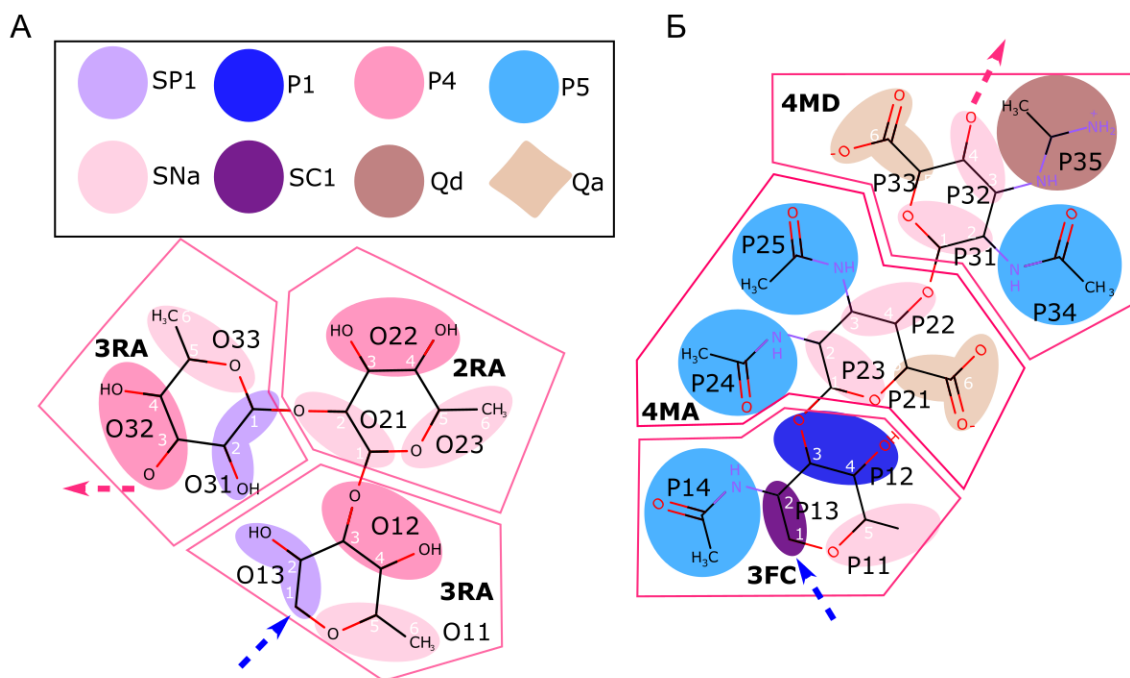


Рисунок 3.1.2.2 – Химические структуры повторяющихся фрагментов CPA (А) и О-специфического антигена типа О5 (Б) ЛПС *P. aeruginosa* с разбиением на структурные фрагменты, соответствующие КЗ частицам. КЗ частицы выделены разными цветами в соответствии с выбранными типами частиц в силовом поле Martini. Место присоединения к коровой части показано синей пунктирной стрелкой, место присоединения следующего повторяющегося фрагмента – розовой

При параметризации липида А и коровой части были опробованы два варианта разбиения на структурные фрагменты, стабильные в МД расчетах финальные варианты которых представлены на рисунке 3.1.2.1 А. Разбиение на химические фрагменты также осуществлялось по аналогии с известными ЛПС моделями [Hsu, 2016; Ma, 2015; Van Oosten, 2016] в рамках философии Martini. Также было принято во внимание, что параметризация остатков сахаров в структуре ЛПС, представляющих собой кольцевые фрагменты, предполагает разбиение сахара в среднем на три КЗ частицы. В созданной модели С1 тип частиц был использован для описания структурных фрагментов, относящихся к жирнокислотным цепям, P5 – для фрагментов, содержащих пептидные связи, P4 – для фрагментов диолов в остатках сахаров, Qa – для отрицательно заряженных фосфатов и карбоксильных групп остатков Кдо, Qd – для положительно заряженных остатков N-аланила и этаноламина. При параметризации валентных углов из модели были исключены углы между тремя КЗ частицами, формирующими кольцевой фрагмент. Суммарный заряд липида А в модели составил -4, в заряд внесли вклад два остатка фосфата, присоединенных к диглюкозамину. Заряд коровой части составил -6, вклад в

которые внесли остатки фосфатов, присоединенные к Нер, и остатки карбоксильных групп, входящие в состав Кдо. Суммарный заряд повторяющегося фрагмента О-специфического антигена типа О5 составил -5, в то время как СРА – нейтрально заряженный полимер. Силовые параметры валентных взаимодействий были получены согласно процедуре, описанной в разделе 2.3.2. Параметризация осуществлялась на основе последних 400 нс проведенных для мембран полноатомных МД расчетов.

Оптимизированные параметры валентных взаимодействий для повторяющихся фрагментов О-антигена О5 и СРА приведены на рисунках 3.1.2.3 и 3.1.2.4 соответственно. Всего КЗ модель молекулы ЛПС, состоящей из липида А, коровой части и пяти повторяющихся фрагментов О-антигена О5, содержала 133 КЗ частицы, 158 связей и 220 углов. КЗ модель молекулы ЛПС, состоящей из липида А, коровой части и пяти повторяющихся фрагментов СРА, содержала 108 КЗ частиц, 133 связей и 151 углов.

Уникальность данных моделей заключается в том, что (1) они содержат модификации коровой части, (2) созданы на основе полноатомных МД расчетов, проведенных в одном силовом поле. Единственная аналогичная модель ЛПС с О-специфическим антигеном РАО1, созданная Ма с соавторами в 2015 г. [Ма, 2015], была создана в результате параметризации отдельных структурных фрагментов ЛПС на основе полноатомных МД расчетов в разных силовых полях (Glycam для липида А и коровой части и Charmm36 для О-антигена). К тому же коровая часть была представлена гликоформой I, к которой в бактериальной клетке не происходит присоединение антигенных цепей.

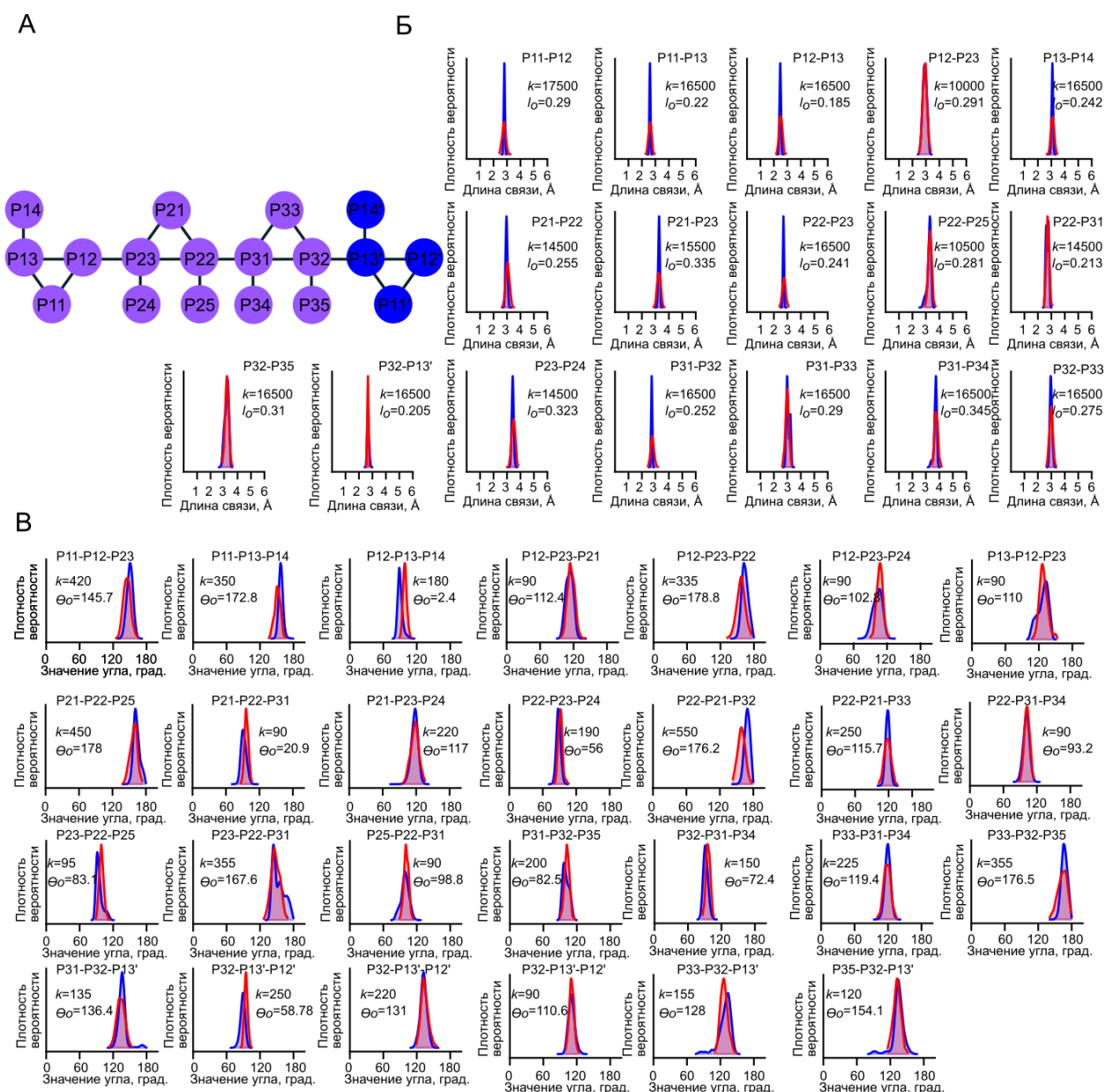


Рисунок 3.1.2.3. Параметризация валентных параметров повторяющегося фрагмента О-антигена РАО1 типа О5, входящего в состав ЛПС *P. aeruginosa*. (А) Схематическое изображение КЗ структуры. Синим показана схема КЗ модели повторяющегося фрагмента, фиолетовым – начало следующего. (Б-В) Распределения для связей (Б) и валентных углов (В) между КЗ частицами. Распределения, полученные на основе анализа полноатомного расчета, показаны синим, на основе КЗ – красным. Для каждого параметра приведены константы жесткости k (для связей в $\text{кДж/моль} \cdot \text{нм}^2$, для углов в $\text{кДж/моль} \cdot \text{рад}^2$), а также равновесные значения длин связей l_0 и валентных углов Θ_0 .

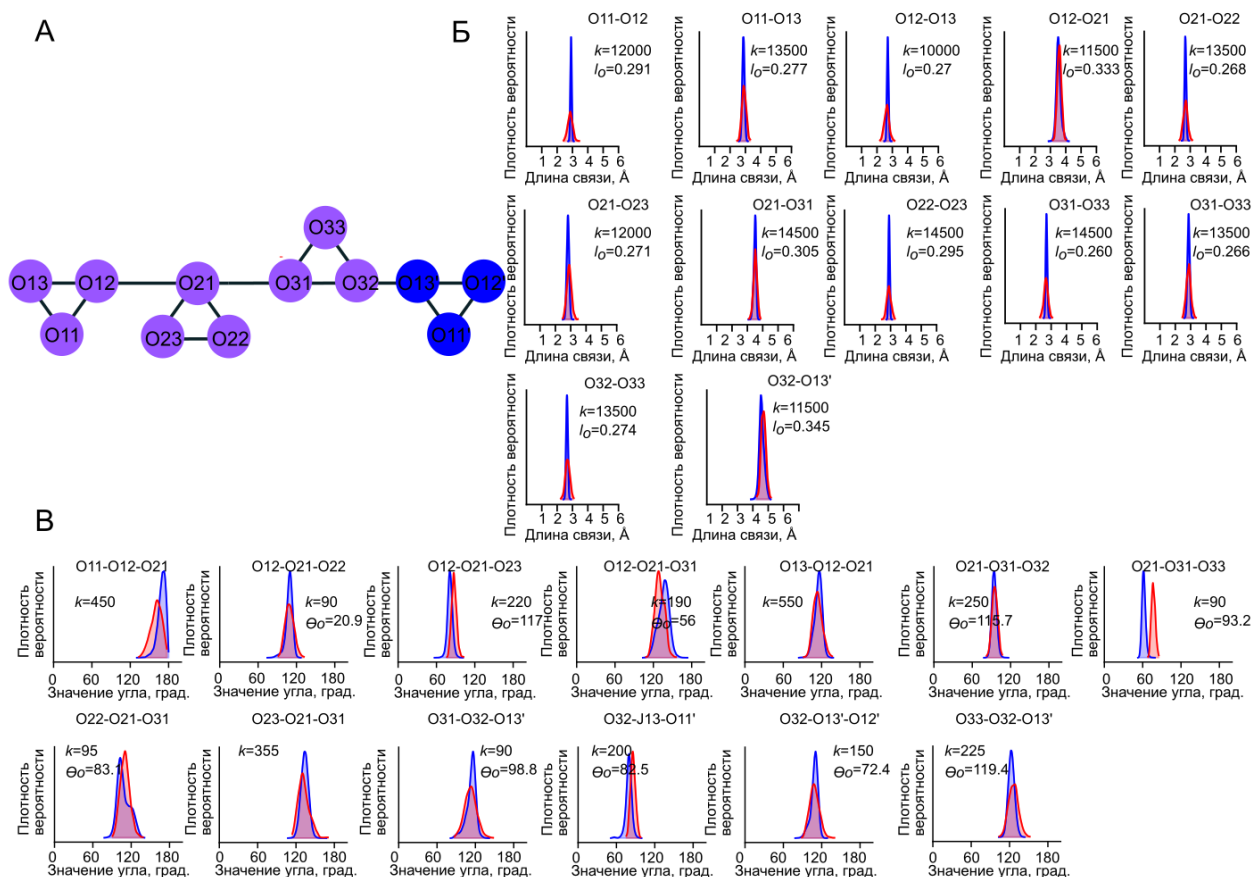


Рисунок 3.1.2.4 – Параметризация валентных параметров повторяющегося фрагмента СРА, входящего в состав бактериального ЛПС *P. aeruginosa*. (А) Схематическое изображение КЗ структуры. Синим показана схема КЗ модели повторяющегося фрагмента, фиолетовым – следующего. (Б-В) Распределения для связей (Б) и валентных углов (В) между КЗ частицами. Распределения, полученные на основе анализа полноатомного расчета, показаны синим, на основе КЗ – красным. Для каждого параметра приведены константы жесткости k (для связей в $\text{кДж/моль} \cdot \text{нм}^2$, для углов в $\text{кДж/моль} \cdot \text{рад}^2$), а также равновесные значения длин связей l_0 и валентных углов Θ_0 .

3.1.3. Взаимодействие катионных антисептиков с липополисахаридными мембранами различного состава

На хорошо известных в качестве модельного объекта клетках *E. coli* K12 показано, что добавление катионных антисептиков различных классов приводит к нейтрализации дзета потенциала. Так, для клеток без добавления антисептиков характерно значение дзета потенциала $-48,7 \pm 0,6$ мВ. При увеличении концентрации антисептиков в диапазоне от 5 до 50 μM происходит сдвиг поверхностного потенциала в область менее отрицательных значений за счет электростатического связывания катионных антисептиков с

отрицательно заряженными элементами бактериальной клеточной стенки (таблица 3.1.3.1). В отличие от остальных антисептиков ОСТ уже при 5 μM вызывал нейтрализацию дзета потенциала примерно на 60%. Бигуаниды и MIR вызывали такой эффект при концентрациях в 10 раз выше. При концентрации ОСТ 5 μM происходила нейтрализация клеточной поверхности практически на 90%.

Таблица 3.1.3.1 – Значения дзета потенциала (мВ) клеток *E. coli* в присутствии антисептиков в различной концентрации

Концентрация, μM	CHL	PIC	MIR	ОСТ
5	$-40,4 \pm 0,6$	$-45,1 \pm 2,7$	$-45,1 \pm 4,1$	$-17,9 \pm 3,1$
10	$-34,8 \pm 0,6$	$-32,7 \pm 5,6$	$-34,7 \pm 5,4$	$-9,1 \pm 0,6$
50	$-17,8 \pm 2,3$	$-20,3 \pm 3,1$	$-16,9 \pm 3,1$	$-5,9 \pm 1,3$

Чтобы понять, как влияет состав наружной ЛПС мембраны, на взаимодействие с катионными антисептиками, на основе созданных КЗ моделей одиночных ЛПС были созданы 5 асимметричных мембран различного состава, внешний монослой которых состоял из: (1) шероховатых ЛПС (PRL); (2) шероховатых ЛПС без остатка фосфоэтаноламина в коровой части (mPRL); (3) 75% шероховатых и 25% гладких ЛПС с О-антигеном O5 (PRL:O5); (4) 75% шероховатых и 25% гладких ЛПС с полирамнозным антигеном (PRL:CPA); (5) 50% шероховатых, 25% гладких ЛПС с О-антигеном O5 и 25% – ЛПС с полирамнозным антигеном (PRL:O5: CPA). О-антигенные цепи и CPA содержали по 12 повторяющихся фрагментов, что соответствует минимальному количеству в ЛПС с короткими О-антигенными цепями, содержащими 12-16 сахаров [Lam, 2011]. Внутренний монослой всех построенных модельных бислоев состоял из липида DPPE. Все исследованные антисептики были добавлены к ЛПС мембранам в соотношении 5/4 антисептик:ЛПС. Длительность каждого МД расчета составила не менее 4 мкс, суммарная длительность всех расчетов – 147 мкс. Детали проведенных КЗ расчетов для оценки взаимодействия антисептиков с ЛПС мембранами различного состава представлены в таблице 3.1.3.2.

Таблица 3.1.3.2 – Детали проведенных КЗ расчетов для изучения взаимодействия катионных антисептиков с ЛПС мембранами различного состава

#	Состав модельного бислоя	КАС	Время МД расчета, мкс	Количество ионов (CA/Na ⁺ /CL ⁻)	Размеры расчетной ячейки (X,Y,Z), нм	Количество КЗ частиц воды
1	72 PRL // 180 DPPE	–	4	360 // 111 // 111	10.14,10.14,15.2	8181
2	54 PRL : 18 O5 // 180 DPPE	–	5,9	360 // 420 // 204	10.15,10.15,26.7	16424
3	54 PRL : 18 CPA // 180 DPPE	–	6	360 // 186 // 186	10.17,10.17,24.8	15692
4	36 PRL : 18 O5 : 18 CPA // DPPE	–	6,7	360 // 420 // 204	10.16,10.16,24.6	13621
5	72 mPRL // 180 DPPE	–	5,3	396 // 111 // 111	10.24,10.24,15.2	8789
6	72 PRL // 180 DPPE	CHL	7,5	360 // 161 // 341	10.22,10.22,21.3	13060
7	54 PRL : 18 O5 // 180 DPPE	CHL	7,4	360 // 265 // 229	10.14,10.14,28.7	17620
8	54 PRL : 18 CPA // 180 DPPE	CHL	5,5	360 // 204 // 384	10.21,10.21,25.6	15774
9	36 PRL : 18 O5 : 18 CPA // DPPE	CHL	5,2	360 // 315 // 279	10.14, 10.14, 34.67	21791
10	72 mPRL // 180 DPPE	CHL	7,2	396 // 204 // 384	10.33,10.33,27.2	18855
11	72 PRL // 180 DPPE	PIC	6,2	360 // 167 // 347	10.15,10.15,22.9	14268
12	54 PRL : 18 O5 // 180 DPPE	PIC	6,1	360 // 315 // 279	10.14,10.14,36.7	24693
13	54 PRL : 18 CPA // 180 DPPE	PIC	4	360 // 291 // 471	10.17,10.17,39.7	28074
14	36 PRL : 18 O5 : 18 CPA // DPPE	PIC	4,7	360 // 327 // 291	10.17,10.17,36.6	23808
15	72 mPRL // 180 DPPE	PIC	7,7	396 // 180 // 360	10.33,10.33,23.8	15908
16	72 PRL // 180 DPPE	MIR	5,5	360 // 285 // 375	10.17, 10.17,41.2	30431
17	54 PRL : 18 O5 // 180 DPPE	MIR	5,1	360 // 510 // 384	10.15, 10.15, 52.8	38777
18	54 PRL : 18 CPA // 180 DPPE	MIR	5,6	360 // 322 // 412	10.14,10.14,44.2	31829
19	36 PRL : 18 O5 : 18 CPA // DPPE	MIR	7	360 // 528 // 402	10.19,10.19,53.5	38678
20	72 mPRL // 180 DPPE	MIR	5,1	396 // 285 // 375	10.26,10.26,40.1	30207
21	72 PRL // 180 DPPE	OCT	4,3	360 // 167 // 347	10.17,10.17,22.2	13355
22	54 PRL : 18 O5 // 180 DPPE	OCT	5,8	360 // 265 // 229	10.13,10.13,28.6	17227
23	54 PRL : 18 CPA // 180 DPPE	OCT	5,4	360 // 204 // 384	10.23,10.23,25.35	15403
24	36 PRL : 18 O5 : 18 CPA // DPPE	OCT	7	360 // 265 // 229	10.20,10.20,26.3	14584
25	72 mPRL // 180 DPPE	OCT	6,5	396 // 173 // 353	10.25,10.25,20.2	12002

Влияние катионных антисептиков разных химических классов на свойства модельных шероховатых ЛПС бислоев

При добавлении антисептиков к шероховатым ЛПС (PRL мембрана) ни один из исследованных антисептиков не проникал во внутреннюю коровую часть. Бигуаниды CHL и PIC сорбировались на поверхности внешней коровой части в виде ковра (рисунок 3.1.3.1 А, Б). Обычно не склонные к агрегации в водных растворах бигуаниды, у поверхности модельной мембраны образовывали слои толщиной в 2-3 молекулы

антисептика. Как видно по профилям плотности (рисунок 3.1.3.1 А, Б, нижние панели), отдельные структурные фрагменты бигуанидов располагались случайным образом. Терминальные и заряженные частицы либо располагались на поверхности бислоя, либо одна из двух терминальных частиц молекулы бигуанида встраивалась в приповерхностную область внешней коровой части. В отличие от бигуанидов молекулы MIR собирались в отдельные мицеллярные агрегаты, которые на 5-ой μ s МД расчета агрегировали в один (рисунок 3.1.3.1 В, нижняя панель). Мицеллярный агрегат контактировал с поверхностью PRL мембраны заряженными частицами, которые погружались в приповерхностный коровый слой. В отличие от остальных антисептиков ОСТ не сорбировался на модельный бислой PRL, однако, как и MIR, проявлял высокую агрегационную способность и его молекулы формировали кластер (рисунок 3.1.3.1 Г). Поскольку антисептики не проникали внутрь коровой части, их присутствие не влияло на площадь, приходящуюся на молекулу ЛПС, (рисунок 3.1.3.2 А), и на толщину бислоя (рисунок 3.1.3.2 Б).

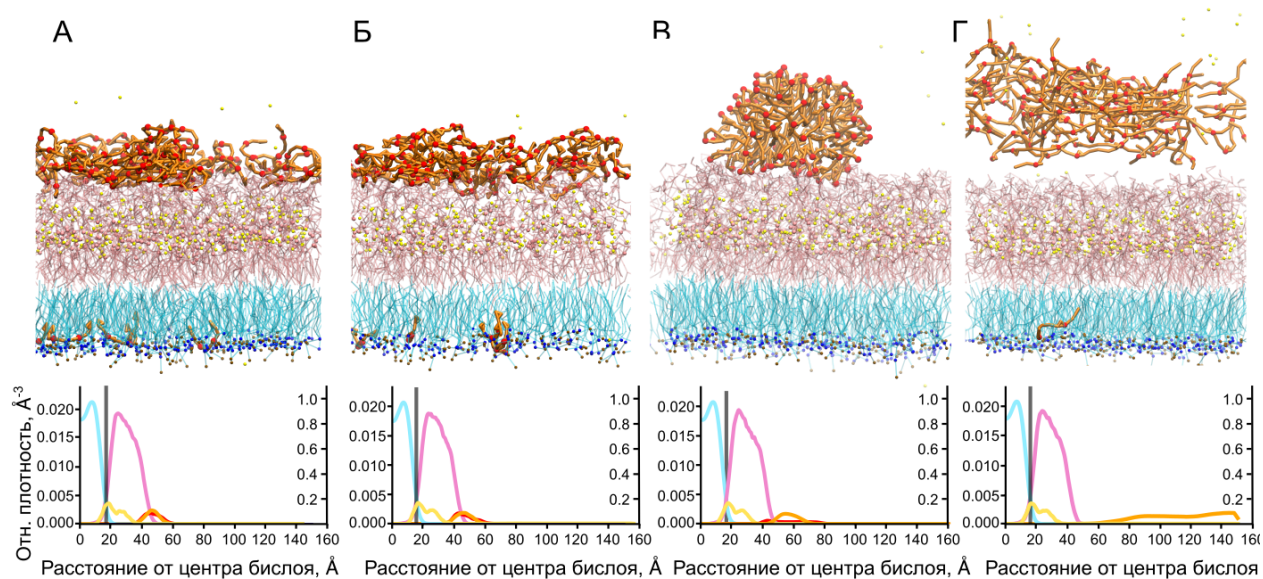


Рисунок 3.1.3.1 – Адсорбция катионных антисептиков на модельный бислой, состоящий из шероховатых ЛПС. Бислоем на последнем кадре МД расчета в присутствии CHL (А), PIC (Б), MIR (В), ОСТ (Г). ЛПС показаны розовым, DPPE – голубым, молекулы антисептика – оранжевым с заряженными частицами, показанными в виде красных сфер. Заряженные частицы коровой части ЛПС показаны розовыми сферами, ионы Ca^{2+} – желтым. Остатки этаноламинов и фосфатов в составе липидов DPPE показаны охристыми и синими сферами соответственно. Профили плотности основных структурных компонентов ЛПС и антисептиков вдоль нормали к мембране представлены в нижней части каждой панели. Голубая кривая – ацильные цепи липида А, розовая – коровая часть ЛПС, желтая – ионы Ca^{2+} , оранжевая – терминальные частицы антисептиков, красная – заряженные частицы антисептиков. Серая вертикальная линия соответствует положению фосфатов липида А

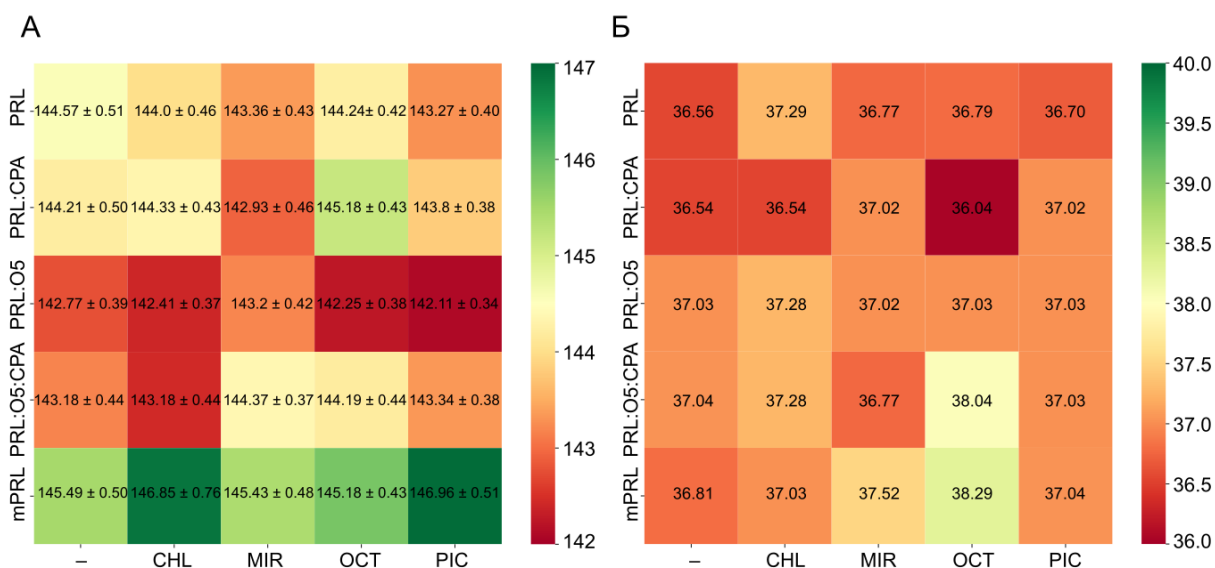


Рисунок 3.1.3.2 – Характеристики модельных ЛПС мембран различного состава в присутствии катионных антисептиков. (А) Площадь на ЛПС ($\text{\AA}^2$); (Б) толщина бислоя ($\text{\AA}$)

При добавлении катионных антисептиков к шероховатым мембранам, за исключением ОСТ, диффузия ЛПС замедлялась практически на порядок (таблица 3.1.3.3). Значение коэффициентов диффузии для модифицированного бислоя без остатков фосфоэтаноламина в составе коровой части ЛПС было примерно в полтора раза меньше по сравнению с коэффициентом диффузии шероховатых ЛПС в немодифицированном бислое. Данный факт может объясняться тем, что несущие больший отрицательный заряд ЛПС без фосфоэтаноламина испытывают более сильное электростатическое отталкивание со стороны соседних молекул в бислое.

Таблица 3.1.3.3 – Коэффициенты латеральной диффузии, рассчитанные для ЛПС мембран различного состава в присутствии антисептиков

#	Состав модельного бислоя	Антисептик	PRL, $10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$	O5 ЛПС, $10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$	CPA ЛПС, $10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$
1	2	3	4	5	6
1	PRL	–	58.78	–	–
2	PRL:O5	–	1.98	3.67	–
3	PRL:CPA	–	2.21	–	2.4
4	PRL:O5:CPA	–	3.257	3.75	3.51
5	mPRL	–	37.73	–	–
6	PRL	CHL	3.66	–	–
7	PRL:O5	CHL	1.49	2.31	–
8	PRL:CPA	CHL	1.63	–	1.71

Продолжение таблицы 3.1.3.3					
1	2	3	4	5	6
9	PRL:O5:CPA	CHL	3.64	3.57	3.53
10	mPRL	CHL	23.91	—	—
11	PRL	PIC	2.35	—	—
12	PRL:O5	PIC	1.44	2.16	—
13	PRL:CPA	PIC	1.78	—	1.89
14	PRL:O5:CPA	PIC	2.924	3.13	3.15
15	mPRL	PIC	39.6	—	—
16	PRL	MIR	8.39	—	—
17	PRL:O5	MIR	1.109	2.15	—
18	PRL:CPA	MIR	1.95	—	1.99
19	PRL:O5:CPA	MIR	1.95	2.17	1.90
20	mPRL	MIR	28.63	—	—
21	PRL	OCT	17.19	—	—
22	PRL:O5	OCT	1.7	1.05	—
23	PRL:CPA	OCT	2.39	—	2.53
24	PRL:O5:CPA	OCT	1.33	1.7	1.37
25	mPRL	OCT	16.28	—	—

Добавление катионных антисептиков, за исключением OCT, приводило к небольшому повышению значений параметра порядка ацильных цепей липида А. Данные для связей *sn*-2 жирных кислот в присутствии антисептиков представлены на рисунке 3.1.3.3. Немного больший упорядочивающий эффект на упаковку ацильных цепей липида А оказывали бигуаниды, которые сорбировались на внешнюю коровую часть в виде ковра и таким образом способствовали тому, что бислой становился более жестким. Аналогичным образом катионные антисептики реагировали с мембранами, в коровой части ЛПС которых отсутствовали остатки фосфоэтаноламина. Такой же характер сорбции антисептиков на модифицированную мембрану mPRL и влияние на упаковку жирных кислот объясняется тем, что данная модификация находится во внутренней коровой части, на третьем по счету остатке Нер. Однако в случае более mPRL, ЛПС в составе которой несут больший суммарный отрицательный заряд, молекулы OCT в виде агрегата в течение МД расчета испытывали процессы сорбции / десорбции на модельный бислой и также приводили к повышению параметров порядка ацильных цепей.

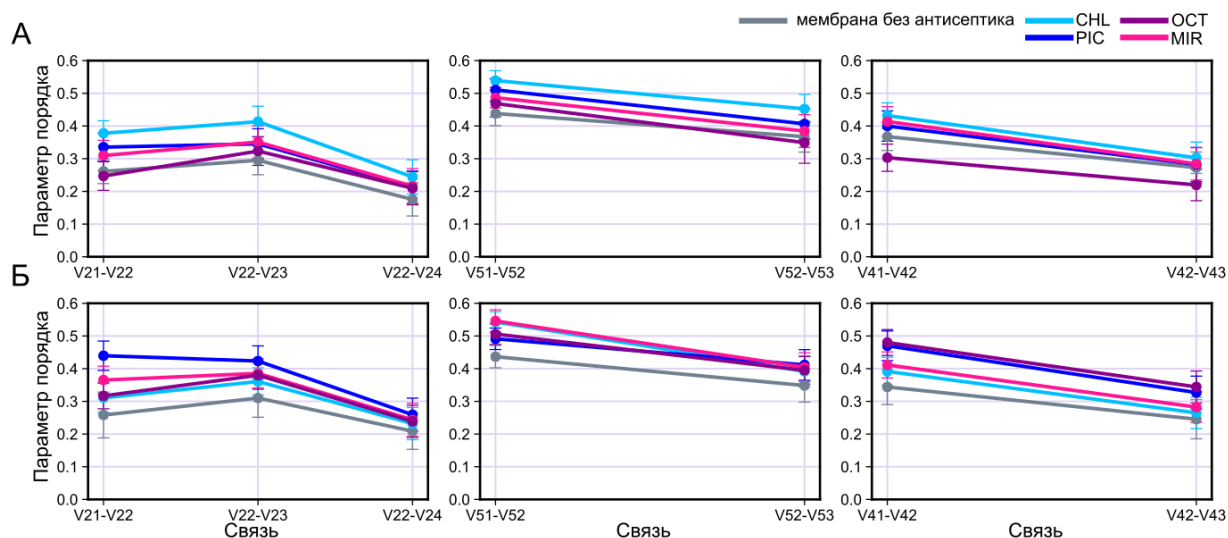


Рисунок 3.1.3.3 – Параметры порядка *sn*-2 жирнокислотных цепей липида А, рассчитанные для типичной шероховатой ЛПС мембраны PRL (А) и для шероховатой ЛПС мембраны без остатков фосфоэтаноламина в коровой части mPRL (Б).

Влияние катионных антисептиков разных химических классов на свойства модельных гладких ЛПС бислоев

Для исследования влияния О-антигенных цепей на взаимодействие с антисептиками были созданы 3 гладких ЛПС мембраны. Присутствие в модельных мембранах PRL:O5 и PRL:CPA 25 % гладких ЛПС или 50% – в мембране PRL:O5:CPA не влияло на такие характеристики бислоя, как площадь на липид и толщина бислоя (рисунок 3.1.3.2). В отличие от шероховатых мембран диффузия молекул ЛПС в данных мембранах замедлялась на порядок (таблица 3.1.3.3). Данный эффект объясняется склонностью антигенных цепей к кластеризации и взаимодействию друг с другом. Как и следовало ожидать, все катионные антисептики сорбировались на PRL:O5 мембраны с отрицательно заряженными О-антигенными цепями в составе ЛПС (рисунок 3.1.3.4). О-антигенные цепи создавали сеть для более равномерного по сравнению с остальными антисептиками связывания бигуанидов: в отличие от представителей ЧАС отдельные молекулы бигуанидов проникали к поверхности внешней коровой части. Бигуаниды благодаря своей химической структуре не склонные к образованию агрегатов и обладающие двумя положительными зарядами, соединяли в виде мостиков соседние О-антигенные цепи (рисунок 3.1.3.4 А, Б), повышая их упорядоченность в целом по сравнению с мембраной в отсутствии антисептиков (рисунок 3.1.3.5 А). Однако большая часть молекул бигуанидов

концентрировалась в районе терминальных 9-12 повторяющихся фрагментов О-антигенных цепей, что подтверждается профилями относительной плотности, представленными на нижней части каждой панели рисунка 3.1.3.4.

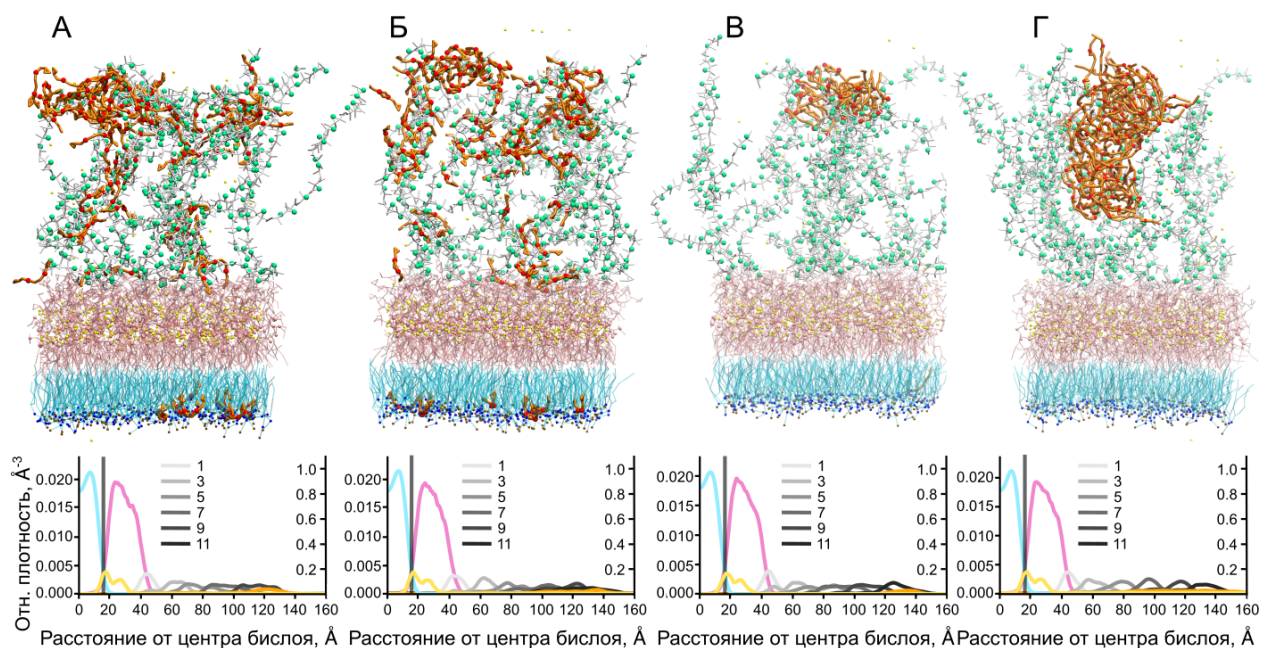


Рисунок 3.1.3.4 – Адсорбция катионных антисептиков на модельный бислой PRL:O5, содержащий гладкие ЛПС. Бислоем на последнем кадре МД расчета в присутствии CHL (А), PIC (Б), MIR (В), ОСТ (Г). Липид А и коровая часть ЛПС показаны розовым, DPPE – голубым, молекулы антисептика – оранжевым с заряженными частицами, показанными в виде красных сфер. Заряженные частицы коровой части ЛПС показаны розовыми сферами, ионы Ca^{2+} – желтым. Остатки этаноламинов и фосфатов в составе липидов DPPE показаны охристыми и синими сферами соответственно. О-антигенные цепи показаны белым, отрицательно заряженные частицы О-антигенных цепей – зелеными сферами. Профили плотности основных структурных компонентов ЛПС и антисептиков вдоль нормали к мембране представлены в нижней части каждой панели. Голубая кривая – ацильные цепи липида А, розовая – коровая часть ЛПС, желтая – ионы Ca^{2+} , оранжевая – терминальные частицы антисептиков, красная – заряженные частицы антисептиков. Серая вертикальная линия соответствует положению фосфатов липида А. Повторяющиеся фрагменты О-антигенной цепи окрашены от белого к черному

Представители ЧАС, MIR и ОСТ, как и в случае с шероховатыми мембранами, формировали агрегаты. Примерно одна треть молекул MIR в виде мицеллярного агрегата сорбировалась на 11-12 терминальные повторяющиеся фрагменты О-антигенных цепей

(рисунок 3.1.3.4 В), остальные молекулы также в виде мицеллярного агрегата оставались в растворе (не показан на рисунке). Присутствие связанных с О-антигенами молекул MIR приводило к повышению упорядоченности расположенных за сайтами связывания MIR 9-10 повторяющихся фрагментов О-антигенных цепей (рисунок 3.1.3.5 А). Молекулы ОСТ собирались в более обширный агрегат, который полностью встраивался в слой О-антигенов вплоть до 3-4 повторяющихся фрагментов (рисунок 3.1.3.4 Г), также вызывая повышение упорядоченности О-антигенных цепей, начиная с 4 повторяющегося фрагмента (рисунок 3.1.3.5 А).

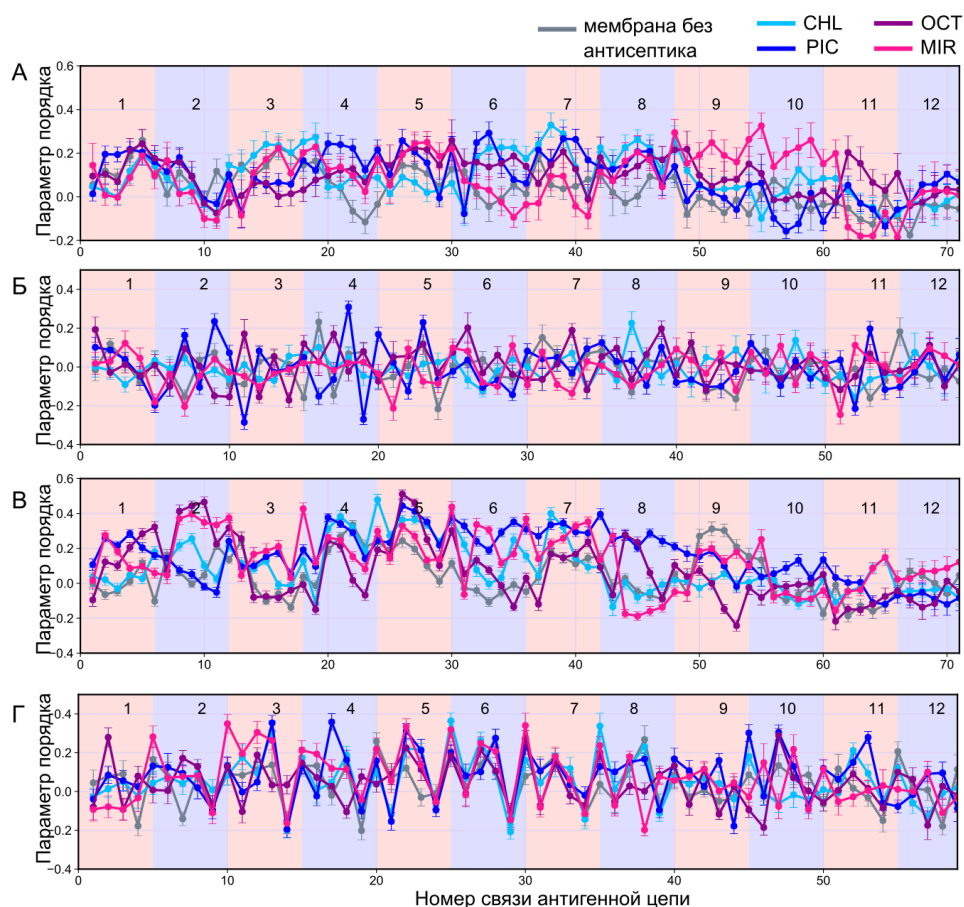


Рисунок 3.1.3.5 – Значения параметра порядка для антигенных цепей в присутствии антисептиков. (А) О5 в составе мембраны PRL:O5; (Б) CPA в составе PRL:CPA; (В) О5 в составе PRL:O5:CPA; (Г) CPA в составе PRL:O5:CPA. Красными и синими цветными прямоугольниками выделены связи, относящиеся к определенному повторяющемуся фрагменту антигенных цепей, номер которого указан сверху

В отличие от О-антигенных цепей типа О5 полирамнозные антигенные цепи с таким же количеством повторяющихся фрагментов и сахаров в одном повторяющемся фрагменте менее вытянуты вдоль нормали к мембране и ориентированы случайным

образом. Так, толщина слоя О-антигенных цепей в PRL:O5 бислое составляла примерно 10 нм, в то время как толщина бислоя антигенных цепей в PRL:CPA составляла всего лишь около 5 нм. Однако несмотря на более плотную компактизацию CPA терминальные повторяющиеся фрагменты не взаимодействуют с коровой частью соседних шероховатых ЛПС в отличие от того, что было показано на КЗ моделях *E. coli* [Jefferies, 2019]. Плотная компактизация CPA и взаимодействие антигенных цепей приводит к отсутствию их упорядоченности относительно нормали к бислою (рисунок 3.1.3.5 Б). Как и в предыдущем случае, бигуаниды и MIR сорбировались на слой антигенных цепей, однако в случае CPA антисептики были распределены по всей толщине этого слоя. В отличие от О-антигенных цепей ОСТ не сорбировался на полирамнозные антигены (рисунок 3.1.3.6). Добавление катионных антисептиков к PRL:CPA не приводило к упорядочиванию полирамнозных антигенов (рисунок 3.1.3.5 Б).

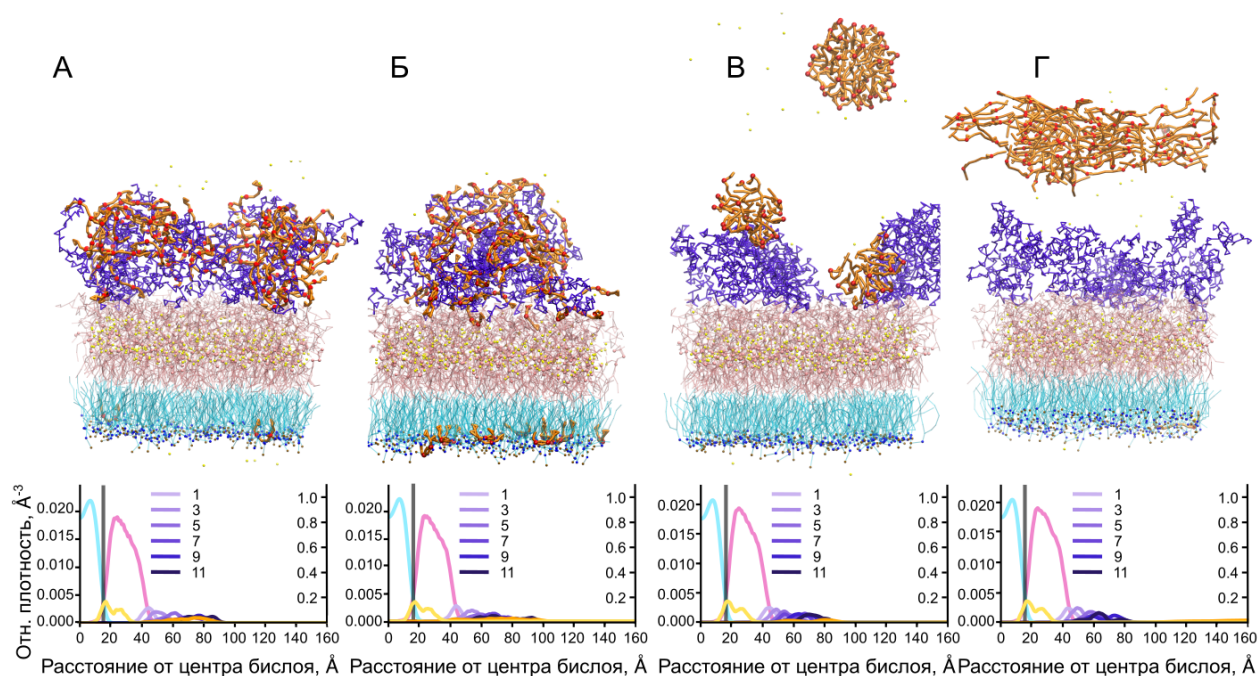


Рисунок 3.1.3.6 – Адсорбция катионных антисептиков на модельный бислой PRL:CPA, содержащий гладкие ЛПС. Бислой на последнем кадре МД расчета в присутствии CHL (А), PIC (Б), MIR (В), ОСТ (Г). Липид А и коровая часть ЛПС показана розовым, антигенные цепи – фиолетовым, DPPE – голубым, молекулы антисептика – оранжевым с заряженными частицами, показанными в виде красных сфер. Заряженные частицы коровой части ЛПС показаны розовыми сферами, ионы Ca^{2+} – желтым. Остатки этаноламинов и фосфатов в составе липидов DPPE показаны охристыми и синими сферами соответственно. Профили плотности основных структурных компонентов ЛПС и антисептиков вдоль нормали к мембране представлены в нижней части каждой панели. Голубая кривая – ацильные цепи липида А, розовая – коровая часть ЛПС, желтая – ионы Ca^{2+} , оранжевая – терминальные частицы антисептиков, красная – заряженные частицы антисептиков. Серая вертикальная линия соответствует положению фосфатов липида А. Повторяющиеся фрагменты О-антигенной цепи окрашены от светло- к темно-фиолетовому

Увеличение концентрации в бислое гладких ЛПС приводило к их вытягиванию вдоль нормали к бислою. В мембране PRL:O5:CRA, содержащей 50 % шероховатых ЛПС в наружном монослое и по 25 % гладких ЛПС с антигенными цепями CRA и O5, происходило увеличение толщины антигенных цепей до 12 нм в случае O5 и до 10 нм в случае CRA. Вытягивание антигенных цепей приводило к общему повышению параметров порядка как O5, так и CRA антигенных цепей (рисунок 3.1.3.5 В, Г соответственно). Характер взаимодействия катионных антисептиков с PRL:O5:CRA мембраной аналогичен таковому для бислоя PRL:O5. Бигуаниды в PRL:O5:CRA бислое были распределены по всему слою антигенных цепей с преимущественной локализацией в районе верхней трети повторяющихся фрагментов (рисунок 3.1.3.7 А, Б). Молекулы MIR и ОСТ сорбировались на поверхности слоя О-антигенных цепей O5 в виде агрегатов. Отдельные молекулы ОСТ проникали вглубь, в область 5-го повторяющегося фрагмента О-антигенных цепей (рисунок 3.1.3.7 В, Г). Добавление бигуанидов и MIR способствовало повышению упорядоченности антигенных цепей (рисунок 3.1.3.5 В, Г).

При культивировании *P. aeruginosa* штамма PAO1 в диапазоне температур 25-45°C и нормальном содержании кислорода в составе клеточной стенки содержатся четыре варианта молекул ЛПС, включая шероховатые, полужероховатые и гладкие формы с О-специфическим антигеном и CRA. Гладкие ЛПС формируют эффективный барьер на пути проникновения антимикробных веществ. В силу отрицательного заряда О-антигены серотипа O5 более эффективно улавливают молекулы катионных антисептиков, не давая им проникнуть внутрь бактериальной клетки. К тому же, более вытянутые по отношению к мембране О-антигены O5 по сравнению с CRA задерживают антисептики на расстояниях, более удаленных от поверхности коровой части. Электронейтральные полирамнозные CRA создают стерический барьер, также улавливая антимикробные вещества, молекулы которых смогли проникнуть ближе к поверхности коровой части, либо отталкивая их, как показано на примере ОСТ. Такая возможная защитная функция CRA согласуется с тем фактом, что при инфекционном процессе преобладающими в составе клеточной стенки клинических изолятов становятся гладкие ЛПС именно с CRA цепями [Lam, 1989], которые делают клетки патогена менее уязвимыми для распознавания элементами иммунной системы.

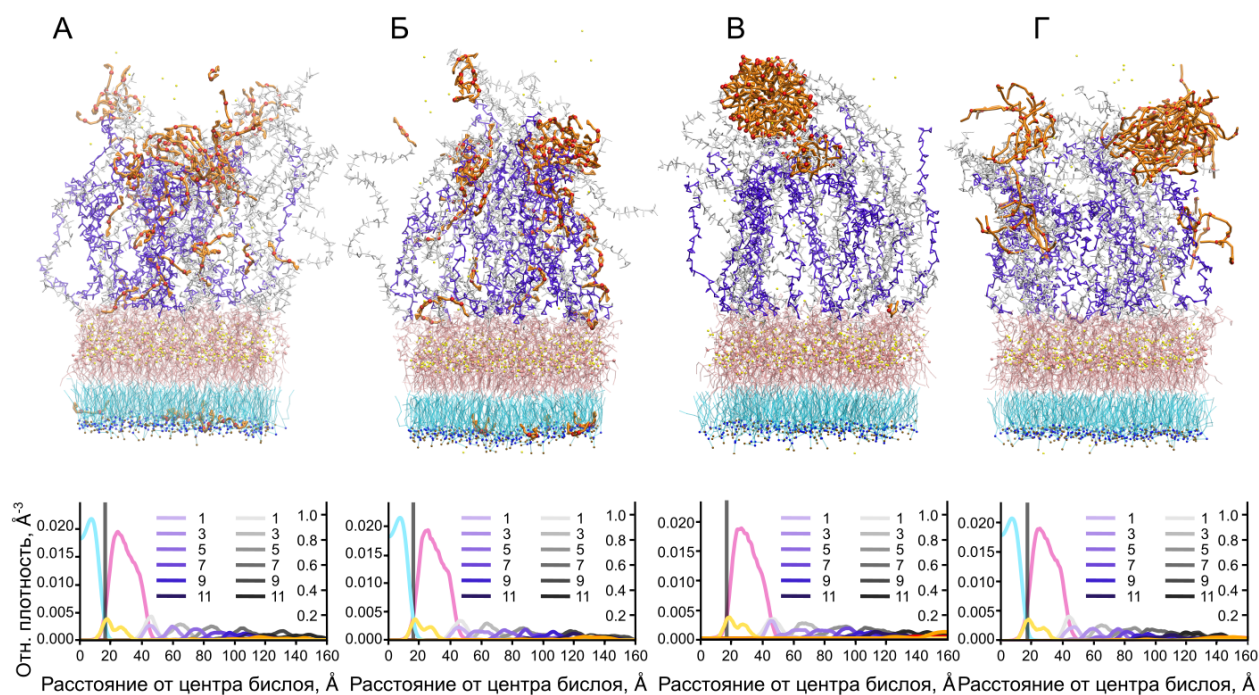


Рисунок 3.1.3.7 – Адсорбция катионных антисептиков на модельный бислой PRL:O5:CRA, содержащий гладкие ЛПС. Бислой на последнем кадре МД расчета в присутствии СНЛ (А), РИС (Б), МІР (В), ОСТ (Г). Липид А и коровая часть показаны розовым, DPPE – голубым, молекулы антисептика – оранжевым с заряженными частицами, показанными в виде красных сфер. Заряженные частицы коровой части ЛПС показаны розовыми сферами, ионы Ca^{2+} – желтым. Остатки этаноламинов и фосфатов в составе липидов DPPE показаны охристыми и синими сферами соответственно. Антигенные цепи CRA показаны фиолетовым, О-антигенные цепи О5 – белым, отрицательно заряженные частицы О-антигенных цепей О5 – зелеными сферами. Профили плотности основных структурных компонентов ЛПС и антисептиков вдоль нормали к мембране представлены в нижней части каждой панели. Голубая кривая – ацильные цепи липида А, розовая – коровая часть ЛПС, желтая – ионы Ca^{2+} , оранжевая – терминальные частицы антисептиков, красная – заряженные частицы антисептиков. Серая вертикальная линия соответствует положению фосфатов липида А. Повторяющиеся фрагменты О-антигенной цепи О5 окрашены от белого к черному, CRA – от светло- к темно-фиолетовому

Также в пользу улавливания катионных антисептиков антигенными цепями клеток *P. aeruginosa* свидетельствуют наши экспериментальные данные по нейтрализации дзета потенциала 500 мкг/мл РИС [Халатян, 2021]. Примечательно также, что при воздействии РИС в такой концентрации на бактериальные клетки, на микрофотографиях, полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии, для *P. aeruginosa* в отличие от *E. coli*

не видно нарушения морфологии клеточной стенки. Однако происходит укорочение клеток и вытекание внутриклеточного содержимого, о чем можно судить по наличию аморфного вещества вокруг конгломератов клеток [Халатян, 2021]. Это позволяет утверждать, что основной мишенью действия антисептиков является плазматическая мембрана и предполагать, что проникновение антисептиков происходит не через ЛПС содержащие участки внешней мембраны, а именно через белковые каналы.

Таким образом, результаты КЗ моделирования подтвердили предполагаемую ранее роль О-антигенных цепей в создании защитного барьера от действия антимикробных веществ. Отсутствие деформации ЛПС бислоев *P. aeruginosa* в присутствии катионных антисептиков как в наших моделях, так и в экспериментах, также доказывают, что бактерицидные эффекты данной группы антимикробных веществ обеспечиваются их влиянием на фосфолипидный бислой плазматической мембраны.

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

Данный раздел написан с использованием материалов статьи [Kholina, 2020]. “Для изучения взаимодействия построенных КЗ моделей катионных антисептиков с модельным бислоем состава POPE:POPG, имитирующим плазматическую мембрану в основной части бактериальной клетки, были проведены МД расчеты на длительных временах при трех различных соотношениях антисептик:липид (1:4, 1:8 и 1:24). Детали проведенных расчетов, включая состав молекулярных систем и время проведенных МД расчетов указаны в таблице 3.1.4.1.

Выбранный диапазон соотношений антисептик / липид соответствует минимальной ингибирующей концентрации (МИК) одного из наиболее изученных антисептиков, бигуанида CHL. В исследовании [Van Oosten, 2017] это соотношение примерно оценивается в диапазоне 1:2 – 1:8. В данной работе авторы предположили, что в составе мембраны бактериальной клетки содержится примерно 3×10^6 фосфолипидов (например, DMPC), в то время как концентрация клеток при типичном измерении МИК составляет 10^{12} колониеобразующих единиц (КОЕ) / л, что соответствует концентрации фосфолипидов $\sim 5 \times 10^{-6}$ М. Репрезентативное значение МИК для CHL ($M_w = 505$) равно 0,5 мг / л [Antonelli, 2019], что составляет $\sim 1 \times 10^{-6}$ М, или же, в соотношении антисептик / липид 1:6.

Таблица 3.1.4.1 – Детали проведенных КЗ расчетов для изучения взаимодействия катионных антисептиков с бактериальной плазматической мембраной состава 180 POPE // 60 POPG

#	Количество молекул КАС	Время МД расчета, μ s	Количество ионов (Na^+/CL^-)	Размеры расчетной ячейки (X,Y,Z), нм	Количество КГ частиц воды
1	–	4,8	73 Na^+ // 13 CL^-	8.7, 8.7, 12.8	5878
2	10 CHL	5	69 Na^+ // 29 CL^-	8.8, 8.8, 13.9	6677
3	10 PIC	3	116 Na^+ // 76 CL^-	8.8, 8.8, 23.5	13142
4	10 MIR	5	79 Na^+ // 29 CL^-	8.7, 8.7, 17.0	7377
5	10 OCT	4	115 Na^+ // 75 CL^-	9.0, 9.0, 22.0	13012
6	30 CHL	3	63 Na^+ // 63 CL^-	9.0, 9.0, 16.1	8605
7	30 PIC	3	63 Na^+ // 63 CL^-	8.85, 8.85, 16.8	8697
8	30 MIR	5	113 Na^+ // 83 CL^-	9.0, 9.0, 23.0	13433
9	30 OCT	3	61 Na^+ // 61 CL^-	9.35, 9.35, 14.9	8418
10	60 CHL	39	14 Na^+ // 74 CL^-	9.0, 9.0, 12.6	5989
11	60 PIC	39	15 Na^+ // 75 CL^-	9.1, 9.1, 12.6	6142
12	60 MIR	12	173 Na^+ // 173 CL^-	9.2, 9.2, 35.9	23694
13	60 OCT	33	25 Na^+ // 85 CL^-	9.9, 9.9, 12.4	7515

Во всех расчетах антисептики полностью адсорбировались на мембране в течение нескольких микросекунд, даже в расчетах систем с самой высокой долей антисептиков. Адсорбция антисептиков сопровождалась встраиванием их гидрофобных участков внутрь модельного бислоя, в то время как положительно заряженные группы располагались рядом с отрицательно заряженными фосфатами липидов на поверхности мембраны, как видно из профилей плотности (рисунок 3.1.4.1). Конформации представителей бигуанидов CHL и пиклоксидином (PIC), демонстрируют форму «скобы» (рисунок 3.1.4.1 А, Б), что согласуется с предыдущими исследованиями, выполненными с применением методов малоуглового рассеяния, ядерного магнитного резонанса и МД [Van Oosten, 2014]. По сравнению с бигуанидами для молекул OCT, обладающих более длинным линкером между двумя положительно заряженными частями, показана более расширенная конформация. Кроме того, терминальные алифатические группы OCT глубже проникали в гидрофобное ядро бислоя (рисунок 3.1.4.1 В).

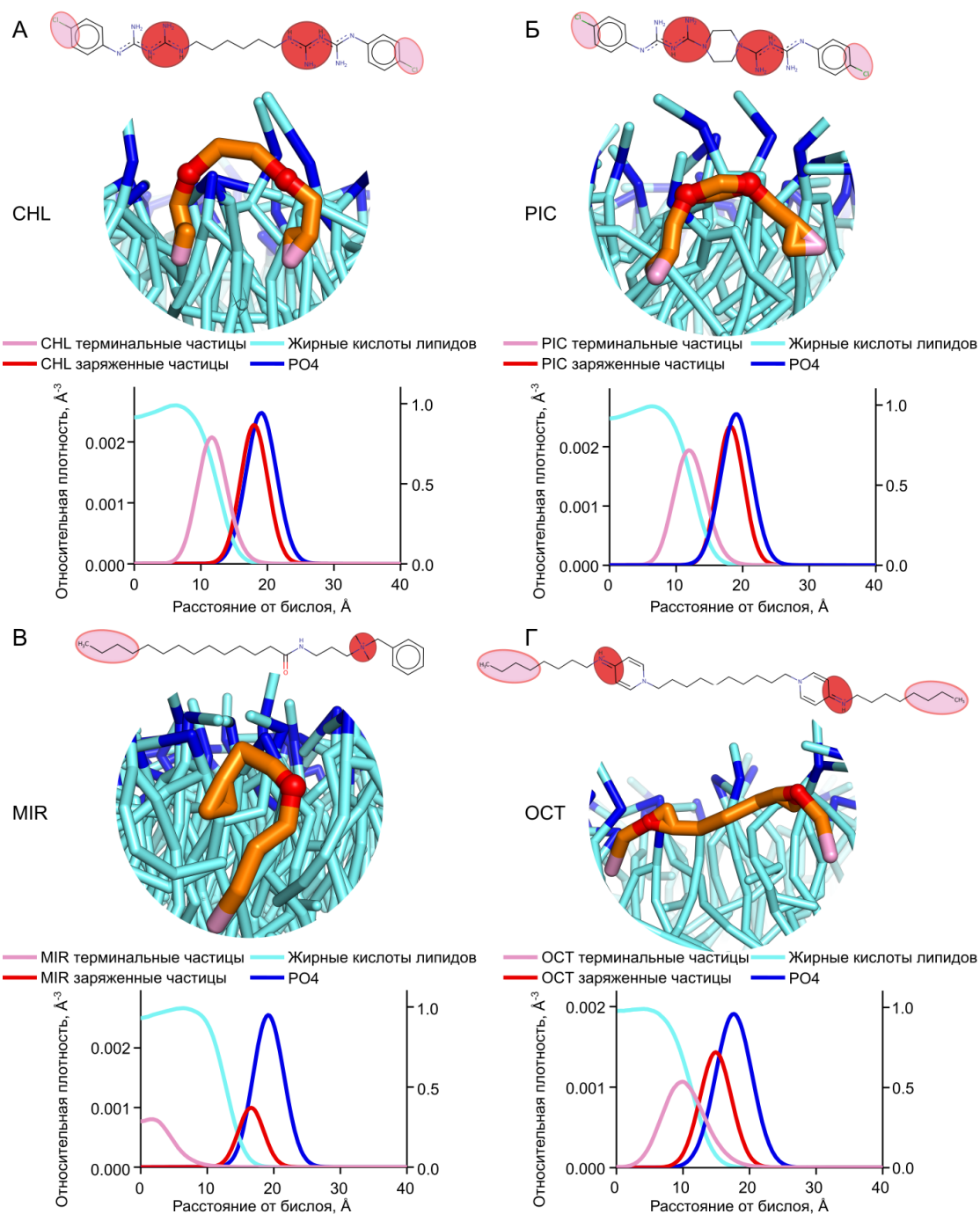


Рисунок 3.1.4.1 – Адсорбция антисептиков на модельную плазматическую мембрану бактерий состава POPE:POPG. (А) хлогексидин (CHL); (Б) пиклоксидин; (В) мирамистин (MIR); (Г) октенидин (OCT). Химическая структура антисептиков показана в верхней части каждой панели; репрезентативные конформации адсорбированных антисептиков показаны в средней части панели (заряженные КЗ частицы антисептиков показаны красным сферами, терминальные – розовыми линиями; остальные КЗ частицы молекулы антисептика показаны оранжевым; жирнокислотные цепи липидов показаны циановым, а остатки фосфатов – синим). Профили плотности основных химических групп антисептиков и липидов вдоль нормали к бислою показаны в нижней части каждой панели

В отличие от других видов катионных антисептиков, молекулы MIR демонстрировали конформацию в виде «крючка», закрепленную длинным гидрофобным хвостом внутри мембраны и с заряженной частью, расположенной в области полярных голов липидов (рисунок 3.1.4.1 Г), что согласуется с работой [Dolgushin, 2019].

В ходе МД расчетов изученные антисептики не дезинтегрировали мембрану, не сольбилизовали отдельные липиды и не вырывали их из плоскости бислоя даже при добавлении самой высокой концентрации антисептика (соотношение антисептик / липид 1:4). Также на исследованном временном промежутке вплоть до 30 мкс не образовались ни переходные трансмембранные поры, ни мембранные выступы. Это свидетельствует о том, антибактериальный эффект катионных антисептиков скорее всего заключается не в прямом нарушении бактериальных мембран, а в результате того, что они вызывают скорее функциональные, нежели чем структурные изменения внутренней цитоплазматической мембраны, что предполагалось ранее [Barrett-Bee, 1994].

На коэффициенты латеральной диффузии липидов POPE и POPG влияли все исследованные антисептики (рисунок 3.1.4.2 А). Однако этот эффект был более заметным для липида POPG по сравнению с POPE, по-видимому, из-за его общего отрицательного заряда и, следовательно, большей склонности к взаимодействию с антисептиками. Изменение коэффициента диффузии было наиболее выраженным для антисептика ОСТ (значение уменьшилось в 3,5 раза для POPE и в 5,3 раза для POPG), в то время как для антисептика MIR изменение данной величины была намного слабее (значение уменьшилось 1,5 раза для POPE и в 2,3 раза для POPG). Это может быть связано с тем фактом, что молекулы MIR несут в своей структуре один положительный заряд в отличие от других антисептиков, которые обладают двойным положительным зарядом. В результате молекулы MIR не способны связывать несколько липидов POPG и образовывать протяженные участки относительно иммобилизованных липидов.

Все изученные антисептики лишь незначительно влияли на среднюю толщину мембраны, за исключением ОСТ в самой высокой концентрации (соотношение ОСТ / липид 1:4), когда наблюдалось значительное утончение модельного бислоя на 5 Å (рисунок 3.1.4.2 Б). Площадь, приходящаяся на одну молекулу липида, закономерно увеличивалась в присутствии всех типов антисептиков (рисунок 3.1.4.2 В). Наиболее заметное изменение данной величины наблюдалось для ОСТ в самой высокой концентрации.

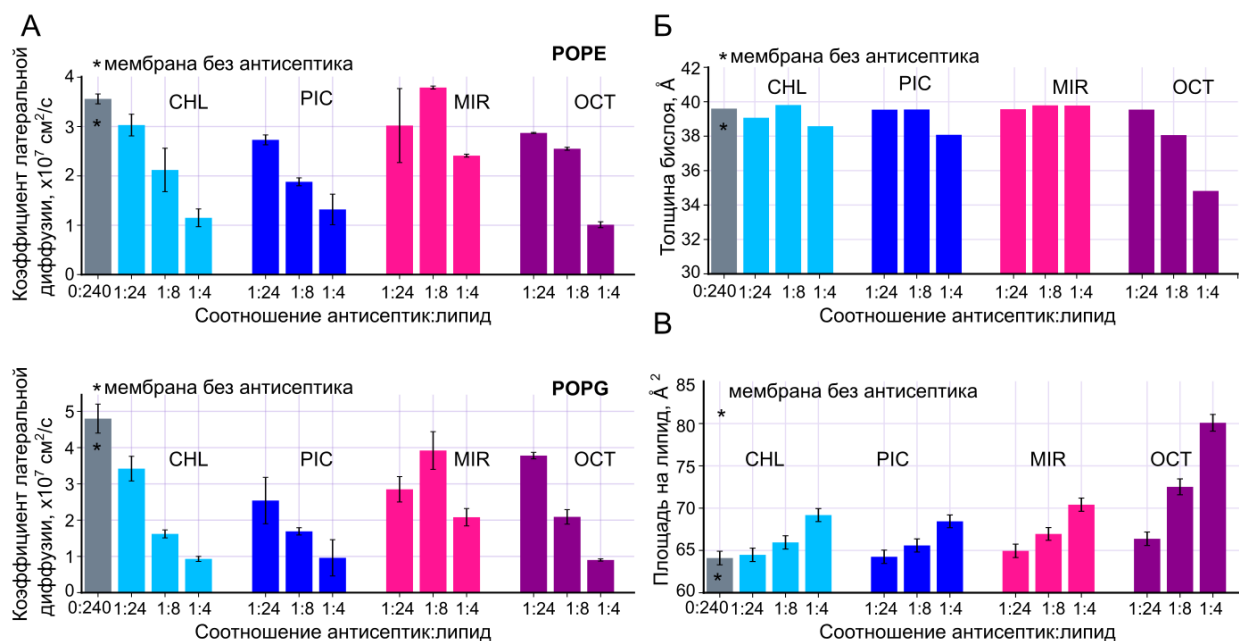


Рисунок 3.1.4.2 – Характеристики модельной мембраны состава POPE:POPG в присутствии катионных антисептиков в различной концентрации. (А) Коэффициенты латеральной диффузии для липида POPE (верхняя панель) и для липида POPG (нижняя панель), (Б) толщина бислоя, (В) площадь на липид. Значения параметров для мембраны без добавления антисептиков показаны серым цветом

Параметры порядка, рассчитанные для связей между соседними КЗ частицами жирнокислотных цепей, ожидаемо уменьшались по мере удаления от полярной головы липидов [Seelig, 1974; Seelig, 1977] как в отсутствии, так и в присутствии молекул антисептика (рисунок 3.1.4.3). По сравнению с антисептиками других химических классов (CHL, PIC, OCT) при добавлении молекул MIR наблюдался обратный эффект на упаковку липидов. Молекулы MIR, обладающие длинными насыщенными гидрофобными хвостами, подобными жирнокислотным цепям липидов, внедрялись глубже в бислой (рисунок 3.1.4.1) с почти незначительным иммобилизирующим эффектом на параметры порядка жирнокислотной цепи (рисунок 3.1.4.3 В). Представители других химических классов исследованных антисептиков обладают более короткими гидрофобными участками, которые не могут проникать так глубоко в липидный бислой, как молекулы MIR, и, таким образом, они не способны эффективно заменять липидные хвосты. Вместо этого, будучи погруженными в область полярных голов липидов, они раздвигают липиды, увеличивая площадь, приходящуюся на один липид, что приводит к очевидному снижению параметра порядка (рисунок 3.1.4.3 А, Б, Г). Схематическая визуализация данного эффекта представлена на рисунке 3.1.4.4. Наблюдаемые для CHL, PIC и OCT эффекты истончения мембраны и разупорядочения жирнокислотных цепей липидов, по-

видимому, похожи по своим молекулярным механизмам на аналогичное действие некоторых катионных пептидов [Huang, 2006].

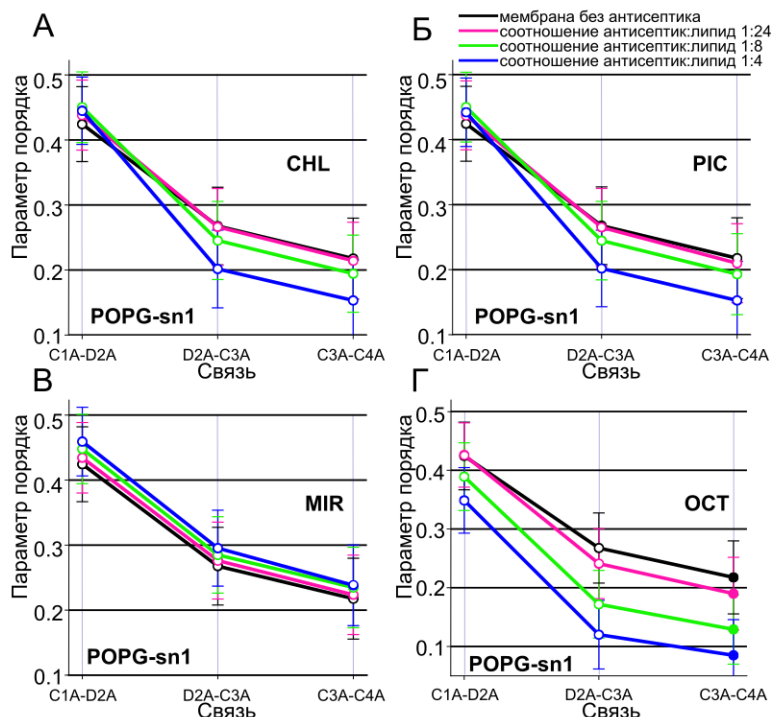


Рисунок 3.1.4.3 – Параметры порядка для *sn1*-жирнокислотных цепей липида POPG в присутствии катионных антисептиков в различной концентрации и в их отсутствии.

(А) CHL; (Б) PIC; (В) MIR; (Г) OCT

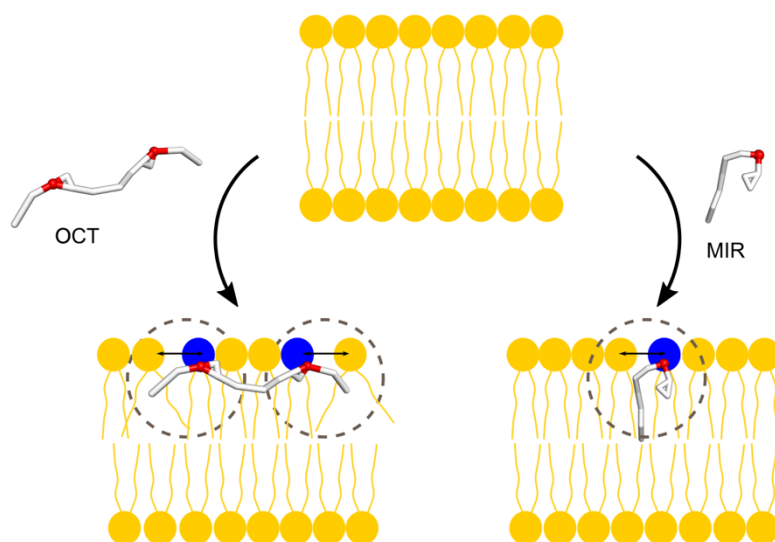


Рисунок 3.1.4.4 – Схематическое изображение разных эффектов, оказываемых на упаковку жирнокислотных цепей липидов антисептиками MIR и OCT

Чтобы исследовать, могут ли катионные антисептики влиять на поведение бислоев, находящихся под внешним электрическим полем, были проведены дополнительные МД расчеты с прикладыванием электрического поля различной амплитуды вдоль нормали к модельным бислоям (уравновешенных систем POPE:POPG в присутствии антисептиков).

Приложение электрического поля напряженностью 150 мВ/нм (соответствует типичному значению, используемому в экспериментальных [Weaver, 1993] и вычислительных исследованиях электропорации [Casciola, 2014; Gurtovenko, 2005; Polak, 2014; Tarek, 2005; Tieleman, 2003] вызывало образование пор (рисунок 3.1.4.5) как в исходном бислое POPE:POPG, так и в бислое со встроенными антисептиками. Однако время порции (т.е. интервал времени от начала моделирования до образования полной трансмембранной водной поры, составило $3,7 \pm 0,9$ нс в случае исходного бислоя POPE:POPG при прикладывании потенциала напряженностью 150 мВ/нм) уменьшалось во всех симуляциях с антисептиками в 1,2-2,6 раза (также при потенциале 150 мВ/нм) в зависимости от конкретного типа антисептика и его концентрации (рисунок 3.1.4.5 Б). При моделировании с более сильными электрическими полями, приложенными к бислою, время порообразования нелинейно снижалось с увеличением приложенного потенциала, что согласуется с многочисленными предыдущими исследованиями [Kotnik, 2019; Polak, 2014; Tarek, 2005]. При моделировании с более низким значением потенциала (100 мВ/нм) не наблюдалось образования трансмембранных пор в исходном бислое POPE:POPG даже после 100 нс моделирования. Тем не менее, при добавлении антисептиков поры образовывались через 26-69 нс, что позволяет предположить, что катионные антисептики способны снижать порог электропорации. Это наблюдение согласуется с опубликованными ранее данными о корреляции минимального значения амплитуды приложенного электрического поля, необходимого для формирования поры, с толщиной мембраны и упаковкой жирнокислотных цепей [Casciola, 2014; Fernandez, 2010; Ziegler, 2008], на которые оказывают влияние три из четырех изученных в данном исследовании катионных антисептика. С другой стороны, снижение порога электропорации при добавлении MIR, который не влияет ни на параметры порядка ацильной цепи, ни на толщину бислоя, может быть связано с увеличением площади на липид, на которую влияет это соединение. Некоторые исследования также предполагают, что последний параметр и включение амфифильных соединений внутрь самих мембран являются факторами, снижающими порог электропорации [Casciola, 2016; Fernandez, 2014; Majhi, 2015].

Во всех случаях при приложении внешнего электрического поля молекулы воды начинают проникать в бислой, образуя так называемый «водяной палец», который растет до тех пор, пока не образуется полная поперечная пора, что согласуется с предыдущими исследованиями, также проведенными с помощью методов моделирования [Kotnik, 2019]. Этот процесс часто инициируется на локальных дефектах двухслойной структуры [Bennett, 2014; Kirsch, 2019]. Результаты нашего моделирования показывают, что встраивание катионных антисептиков в мембраны приводит к возникновению различных локальных неоднородностей (таких как флуктуации толщины, утончение мембраны и преимущественное взаимодействие катионных антисептиков с липидами POPG), что в конечном итоге должно повысить вероятность порации [Kirsch, 2016].

Анализ времени порации выявил отчетливые зависимости от концентрации для разных классов антисептиков. Для бигуанидов (CHL и PIC) увеличение концентрации при постоянном значении внешнего поля приводит к более длительному времени порации (рисунок 3.1.4.5 Б), что может происходить из-за образования полужесткого каркаса этими двухзарядными частицами, связывающими липиды в протяженные участки (рисунок 3.1.4.6 А). Последнее проявляется гораздо более высоким пиком POPG:POPG радиальной функции распределения на $\sim 9,5 \text{ \AA}$ по сравнению с несущим единственный заряд MIR и чистым бислоем (рисунок 3.1.4.6 В), что соответствует большему количеству не прямых контактов между двумя липидами POPG, чему способствует антисептик, несущий двойной положительный заряд. Более того, величина радиальной функции распределения на пике увеличивается с увеличением концентрации антисептика (рисунок 3.1.4.6 Г), что подтверждает зависимость упорядочивающего эффекта бигуанидов от концентрации. Последнее также подтверждается зависимым от концентрации антисептиков уменьшением коэффициентов диффузии липидов (рисунок 3.1.4.2 А). Для ОСТ, также несущего двойной положительный заряд, не наблюдалось четкой зависимости времени порации от концентрации, несмотря на его аналогичное влияние на коэффициенты диффузии. Это может объясняться как результат противодействия процессу истончения мембраны, особенно выраженному в присутствии ОСТ (рисунок 3.1.4.2 Б). Кроме того, для ОСТ не наблюдали никаких эффектов, оказываемых на упорядочение мембраны, по-видимому, из-за более длинного и, следовательно, более гибкого линкера между его заряженными частями. Наконец, MIR продемонстрировал обратную тенденцию: время порации слегка уменьшалось с увеличением концентрации.

Наблюдаемые эффекты различных типов катионных антисептиков на порог электропорации и время образования пор позволяют предположить, что начальный этап антисептического действия на бактериальные клетки может быть связан со снижением

трансмембранного потенциала из-за усиленного порообразования, вызывающего разобщение и угнетение дыхательных и осморегуляторных процессов.

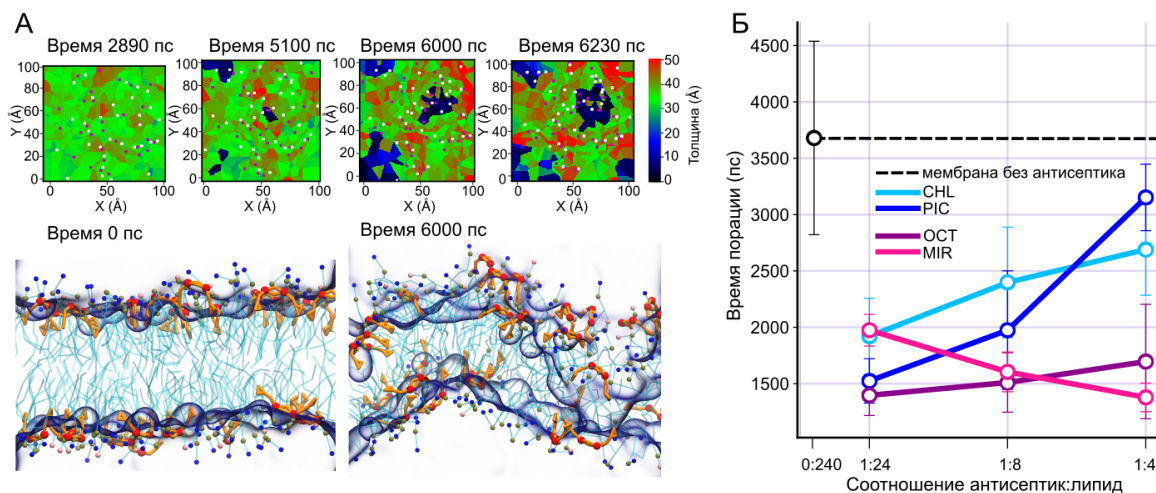


Рисунок 3.1.4.5 – Электропорация бислоя POPE:POPG в присутствии антисептиков. (А) Последовательные этапы формирования трансмембранной поры в модельном бислое в присутствии пиклоксидина (PIC) под воздействием внешнего электрического поля напряженностью 150 мВ/нм. На верхней панели показана локальная толщина мембраны (белые точки показывают расположение антисептиков, фиолетовые точки – POPG). Нижняя панель иллюстрирует изменение формы мембраны при образовании поры. Липиды POPE и POPG и показаны в виде полупрозрачных линий с остатками фосфата, этаноламина и глицерола, изображенными в виде маленьких розовых, охристых и синих сфер; PIC показан оранжевым, заряженные КЗ частицы молекул антисептика отображены в виде больших красных сфер. Вода и ионы показаны в виде фиолетовой полупрозрачной поверхности. (В) Время порации модельной мембраны POPE:POPG в отсутствии антисептиков (черная линия) и в присутствии антисептиков в различных концентрациях (отражены разными цветами) при приложении электрического поля (150 мВ/нм). Средние значения времени порации (более 5 повторов) представлены с планками ошибок, соответствующих стандартному отклонению

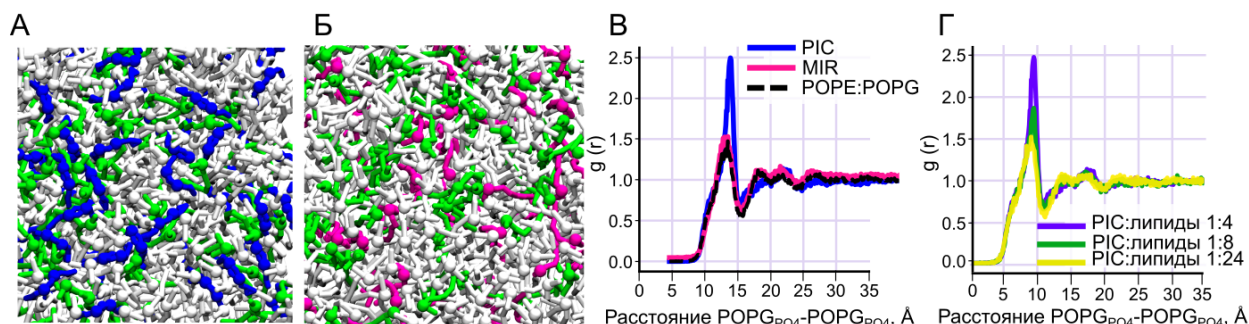


Рисунок 3.1.4.6. Эффект кластеризации заряженных липидов в модельной мембране в присутствии антисептиков. Поверхность модельного бислоя в присутствии пиклоксидина (PIC) (А) и мирамистина (MIR) (Б) в соотношении антисептик:липид 1:4. POPE липиды показаны белым, POPG – зеленым, PIC – синим, MIR – розовым. Заряженные КЗ частицы липидов и антисептиков показаны сферами. (В) Радиальные функции распределения между фосфатами отрицательно заряженных липидов POPG в присутствии PIC (синяя кривая) и MIR (розовая кривая), рассчитанные для системы с добавлением антисептика в соотношении антисептик:липид 1:4, черная кривая – для бислоя без добавления антисептиков. (Г) Радиальные функции распределения между фосфатами отрицательно заряженных липидов POPG в присутствии PIC в трех разных концентрациях. Желтая кривая – для соотношения PIC:липиды 1:24, зеленая – 1:8, фиолетовая – 1:4. ”

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

Данный раздел написан с использованием материалов статьи [Холина, 2021]. “Известно, что на полюсах грамотрицательных бактериальных клеток в плазматических мембранах присутствуют микродомены из молекул кардиолипина [Mileykovskaya, 2000; Mileykovskaya, 2005; Mileykovskaya, 2009; Strahl, 2017]. Под действием катионных антисептиков наблюдаются разрывы клеточных стенок, в том числе на полюсах бактериальных клеток [Халатян, 2021; Cheung, 2012]. Чтобы промоделировать этот эффект и установить молекулярный механизм антибактериального действия катионных антисептиков на кардиолипин содержащие участки плазматической мембраны грамотрицательных бактериальных клеток, были построена молекулярная КЗ модель бислоя состава POPE:POPG:CDL2 в соотношении 81:7:12. Детали проведенных расчетов, включая состав молекулярных систем и время проведенных МД расчетов указаны в таблице 3.1.5.1.

Таблица 3.1.5.1 Детали проведенных КЗ расчетов для изучения взаимодействия катионных антисептиков с бактериальной плазматической мембраной состава 410 POPE // 36 POPG // 30 CDL2

#	Количество молекул КАС	Время МД расчета, μ s	Количество ионов (Na^+/CL^-)	Размеры расчетной ячейки (X,Y,Z), нм	Количество КГ частиц воды
1	—	3	167 $\text{Na}^+//$ 71 CL^-	12.65, 12.65, 15.77	16322
2	60 CHL	8,5	208 $\text{Na}^+//$ 232 CL^-	12.82, 12.82, 25.24	30144
3	119 CHL	22,9	196 $\text{Na}^+//$ 338 CL^-	13.16, 13.16, 28.47	36520
4	60 PIC	8,1	207 $\text{Na}^+//$ 231 CL^-	12.78, 12.78, 25.32	30070
5	119 PIC	22,9	244 $\text{Na}^+//$ 386 CL^-	12.98, 12.98, 33.68	43104
6	60 MIR	4,1	403 $\text{Na}^+//$ 367 CL^-	13.03, 13.03, 39.79	52770
7	119 MIR	30,4	731 $\text{Na}^+//$ 377 CL^-	13.25, 13.25, 36.93	50034
8	60 OCT	6,4	271 $\text{Na}^+//$ 295 CL^-	13.33, 13.33, 29	38774
9	119 OCT	35,8	235 $\text{Na}^+//$ 377 CL^-	13.61, 13.61, 30.15	41985

Так же как и в случае упрощенного модельного бислоя состава POPE:POPG, имитирующего плазматическую мембрану в основной части клетки, к бислою, модифицированному кардиолипинами, добавлялись антисептики в разной концентрации. Для антисептиков были выбраны соотношения антисептик:липид 1:8 и 1:4. Как и в случае бислоя состава POPE:POPG, в присутствии катионных антисептиков наблюдалось

снижение коэффициентов латеральной диффузии липидов (рисунок 3.1.5.1 А). Толщина бислоя снижалась незначительно (рисунок 3.1.5.1 Б), площадь на липид увеличивалась в присутствии всех исследованных антисептиков (рисунок 3.1.5.1 В).

В присутствии всех типов антисептиков, кроме MIR, наблюдалось снижение параметров порядка для жирнокислотных цепей липида POPE (рисунок 3.1.5.2 А). Причем для липида POPE наблюдались такие же эффекты, как и для POPG. Для молекул CDL2 было показано снижение параметров порядка в присутствии всех антисептиков, кроме MIR (рисунок 3.1.5.1 Б). Это может быть объяснено тем, что жирнокислотные цепи кардиолипинов более длинные, поэтому несмотря на более предпочтительное встраивание MIR в участки бислоя, содержащие отрицательно заряженные липиды POPG и CDL2, гидрофобные хвосты MIR преимущественно взаимодействуют с более короткими жирнокислотными цепями липидов POPE и POPG, способствуя их упорядочиванию.

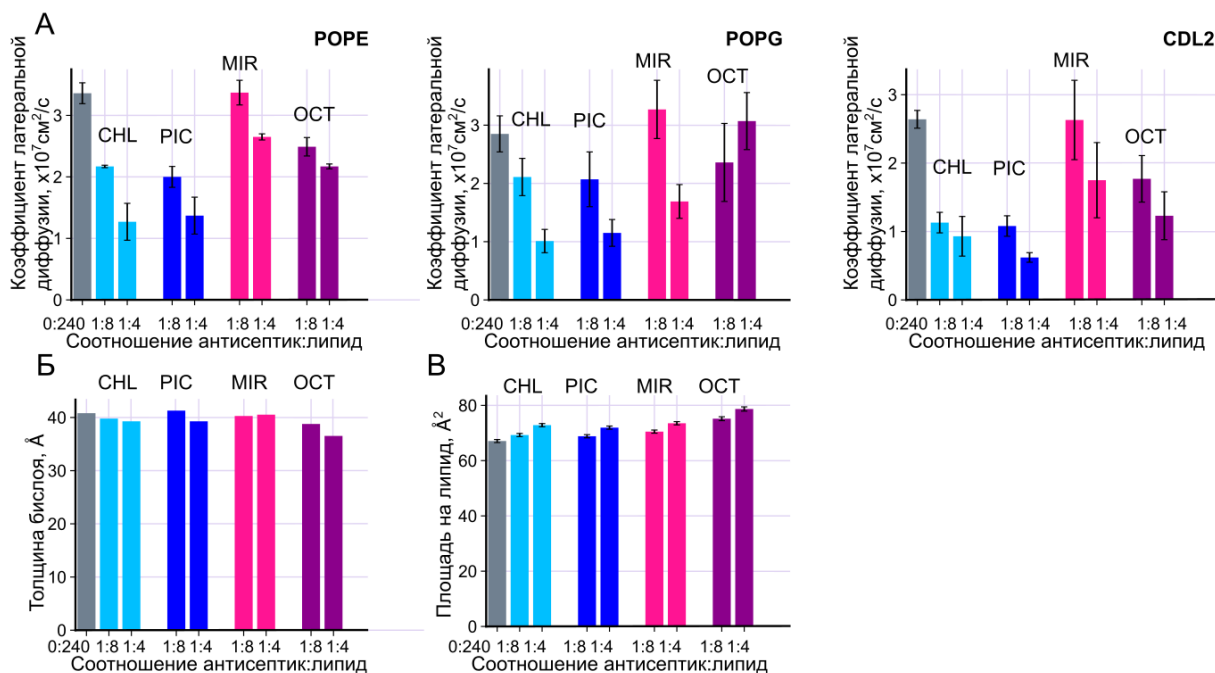


Рисунок 3.1.5.1 – Характеристики модельной мембраны, модифицированной кардиолипином, в присутствии катионных антисептиков в различной концентрации. (А) Коэффициенты латеральной диффузии для липида POPE (левая панель), POPG (средняя панель), CDL2 (правая панель); (Б) толщина бислоя, (В) площадь на липид. Значения параметров для мембраны без добавления антисептиков показаны серым цветом

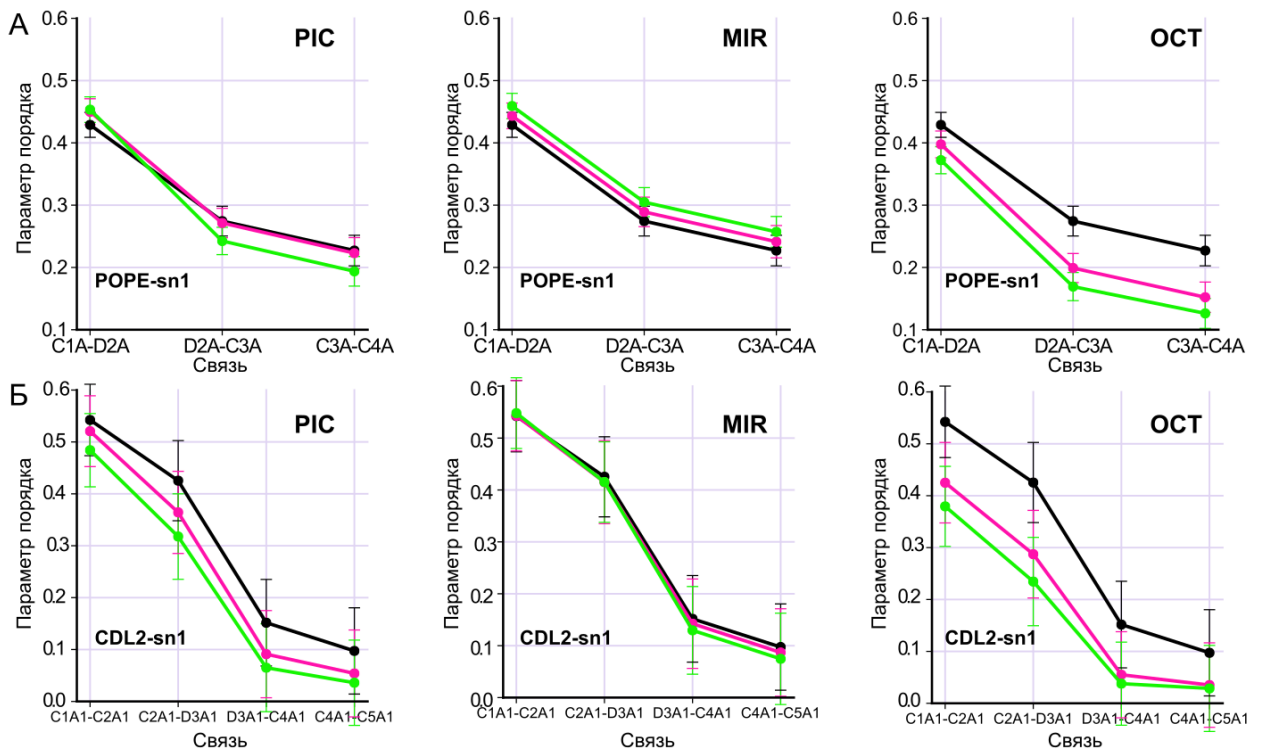


Рисунок 3.1.5.2 – Параметры порядка для *sn1*-жирнокислотных цепей липидов модельной мембраны состава POPE:POPG:CDL2 в присутствии катионных антисептиков в различной концентрации. (А) POPE; (Б) CDL2. Черная кривая описывает параметры порядка для мембраны без добавления антисептиков, красная – с добавлением антисептиков в соотношении 1:24, зеленая – 1:8

Также было показано, что ОСТ в высокой концентрации способствует формированию в бислое кардиолипинового микродомена. При этом вначале происходит встраивание части молекул ОСТ в бислой с последующим стягиванием отрицательно заряженных молекул кардиолипина и фосфатидилглицерола в кластер. Остальные молекулы ОСТ в растворе довольно быстро собирались в мицеллярный агрегат, что связано с наличием большого количества гидрофобных участков в составе их молекул (помимо терминальных концевых участков, между фрагментами пиридина присутствует длинный гидрофобный линкер). Образовавшийся мицеллярный агрегат сорбировался на кардиолипиновый домен (рисунок 3.1.5.3 А), и существовал в таком состоянии несколько микросекунд. При этом происходило нарушение симметричности расположения молекул POPE во внешнем и внутреннем монослое, что подтверждается смещением пиков полярных голов липидов POPE во внешнем монослое относительно среднего положения фосфатов на профилях относительной плотности компонентов системы вдоль нормали к бислою (рисунок 3.1.5.3 Б). В момент времени около 18 мкс происходило постепенное

вырывание молекул POPE, находящихся рядом с кардиолипидным микродоменом (рисунок 3.1.5.4 А). Процесс вырывания длился около двух микросекунд (рисунок 3.1.5.4 Б).

Таким образом, результаты нашего КЗ моделирования позволяют утверждать, что мембрано-активные свойства ОСТ определяются составом и локальной концентрацией липидов в бактериальной плазматической мембране. Результатом действия ОСТ являются структурные и функциональные нарушения, в частности нами выявлены эффекты ОСТ на процессы миграции энергии в кардиолипид-содержащих участках фотосинтетических бактериальных мембранах хроматофоров *Rb. Sphaeroides* [Strakhovskaya, 2021].

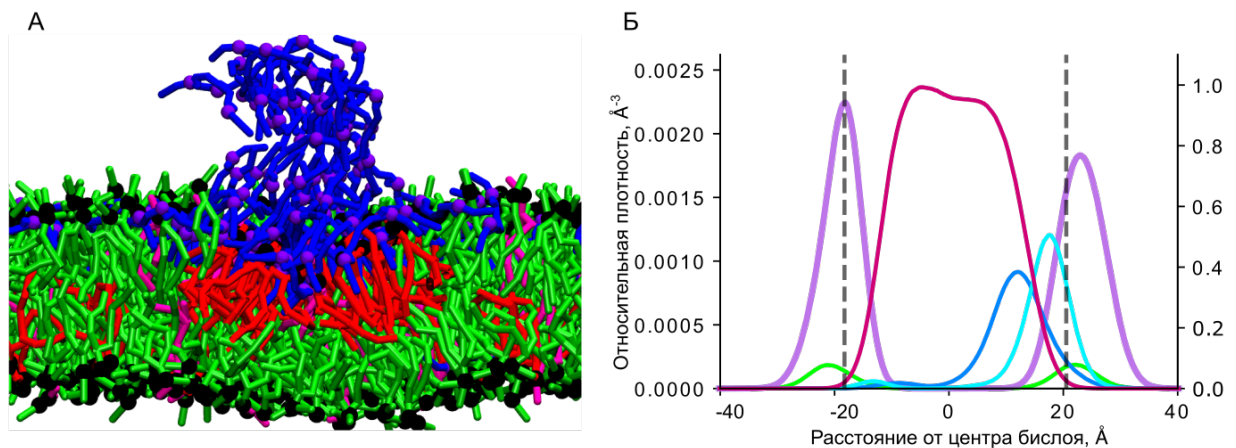


Рисунок 3.1.5.3 – Эффект кластеризации кардиолипидов (CDL2) в присутствии ОСТ в соотношении антисептик: липид 1:4. (А) Кадр МД расчета после 15 мкс расчета. Зеленым показаны липиды POPE, розовым – POPG, красным – CDL2, синим – молекулы ОСТ. Черными сферами показаны фосфаты, фиолетовыми – заряженные частицы молекул ОСТ. (Б) Профили плотности различных компонентов модельной мембраны. Розовым показан профиль плотности жирнокислотных цепей липидов, циановым – заряженных частиц ОСТ, голубым – терминальных частиц ОСТ, фиолетовым – NH₃ частиц (этанолламин) липида POPE, зеленым – GL0 частиц (глицерол) липида POPG. Серыми пунктирными линиями показаны усредненные положения фосфатов. Профили плотности для жирнокислотных цепей нормированы на максимум пикового значения, показаны по второй оси ординат (справа)

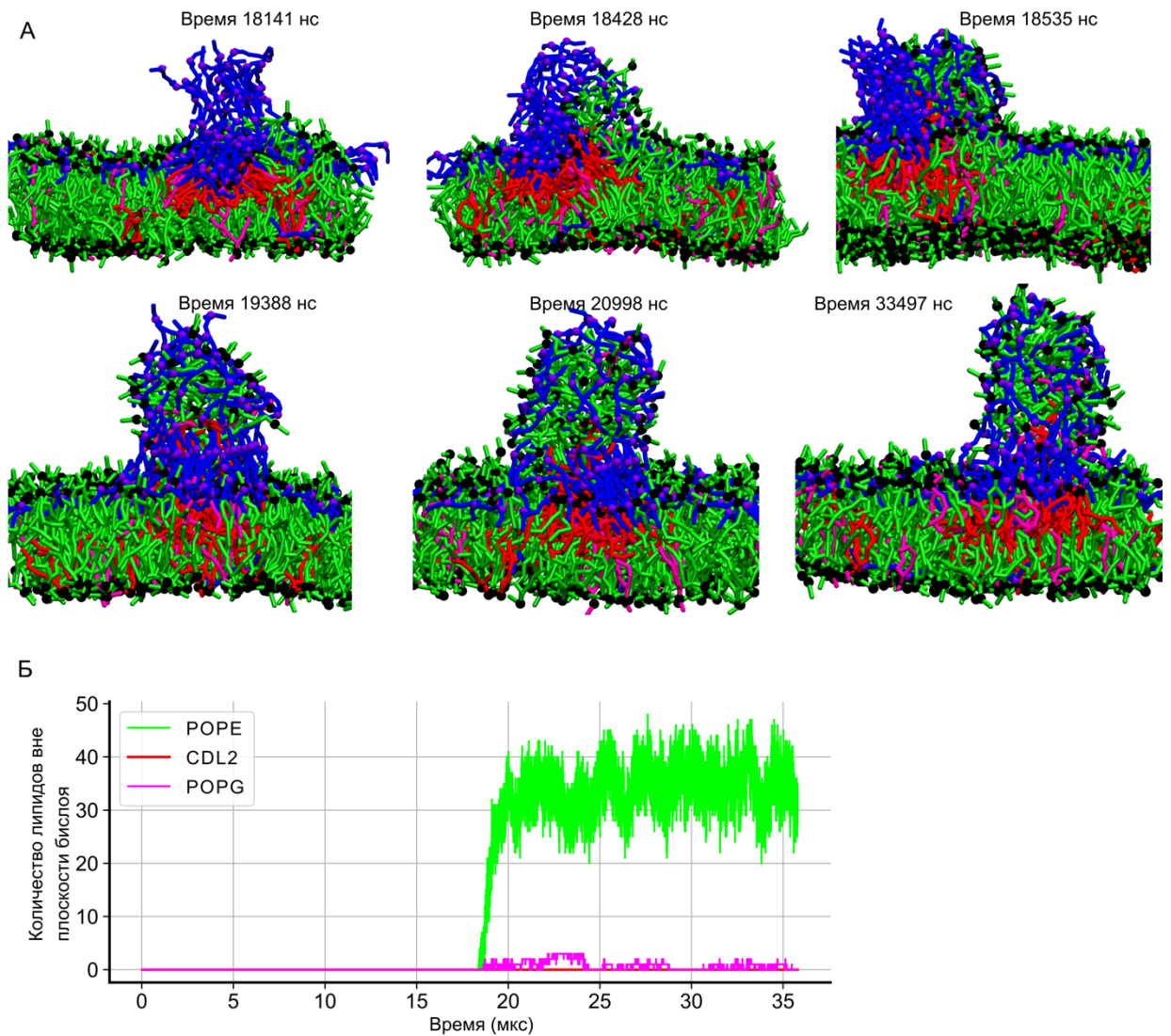


Рисунок 3.1.5.4 – Эффект вырывания липидов из бислоя, модифицированного кардиолипинами (CDL2), молекулами октенидина (ОСТ), добавленными в соотношении антисептик:липид 1:4. (А) Последовательные кадры МД расчета в разные моменты времени. Зеленым показаны липиды POPE, розовым – POPG, красным – CDL2, синим – молекулы ОСТ. Черными сферами показаны фосфаты, фиолетовыми – заряженные частицы ОСТ. (Б) Количество вырванных из бислоя липидов в зависимости от времени МД расчета”

3.2. Изучение взаимодействия металлофталоцианина цинка с модельными мембранами различного состава

Изучение связывания молекул $ZnPc^{8+}$ с модельными мембранами различного состава

Данный раздел написан с использованием материалов статьи [Orekhov, 2018]. “Ранее нами была создана молекулярная модель октакис(холинил)фталоцианина цинка ($ZnPc^{8+}$). Поскольку химический образец $ZnPc^{8+}$ представляет собой смесь изомеров с различным положением заместителей в макроциклическом ядре, нами была определена преобладающая среди продуктов синтеза структура с помощью функций Фукуи. Для этой структуры были проведены квантово-химические расчеты для оптимизации геометрии и определения парциальных зарядов, на основании чего была создана полноатомная модель данного соединения [ААХолина, 2015]. Для создания крупнозернистой модели $ZnPc^{8+}$ его полноатомная структура была разбита на крупнозернистые частицы и на основании полноатомного молекулярно-динамического расчета были параметризованы валентные термы, описывающие взаимодействия между крупнозернистыми частицами [Orekhov, 2018].

Для понимания молекулярных механизмов взаимодействия молекул $ZnPc^{8+}$ с бактериальными мембранами, нами были созданы два типа упрощенных бислоев: (1) симметричный бислой состава POPE:POPG в качестве модели внутренней мембраны грамотрицательных бактерий [Amos, 2016; Mukherjee, 2017]; (2) асимметричный бислой, состоящий из ЛПС шероховатого типа во внешнем монослое и липидов DPPE во внутреннем монослое (ЛПС // DPPE), в качестве модели внешней мембраны клинически значимых грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa* [Dias, 2014]. Детали проведенных расчетов, включая состав молекулярных систем и время проведенных МД расчетов указаны в таблице 3.2.1.

Для изучения начальных этапов связывания $ZnPc^{8+}$ с модельными мембранами выбранного состава, были проведены равновесные МД расчеты адсорбции десяти молекул $ZnPc^{8+}$ в течение 1 μ s моделирования.

Таблица 3.2.1 – Детали проведенных КЗ расчетов для изучения взаимодействия ZnPc^{8+} с биологическими мембранами разного типа

#	Состав мембраны	N ZnPc^{8+}	Ионы	Темп., К	Время, μs	Размеры расчетной ячейки (X,Y,Z), нм	Площадь на липид, нм^2	Кол-во КЗ частиц воды
1	72 ЛПС//180 DPPE	10	$\text{Ca}^{2+}/\text{Cl}^-$	310	1	11.4, 8.2, 18.3	1.30//0.52	9165
2	72 ЛПС//180 DPPE	10	Na^+/Cl^-	310	1	11.4, 8.2, 18.2	1.30//0.52	9159
3	25 ЛПС:73 DPPE//169 DPPE	10	$\text{Ca}^{2+}/\text{Cl}^-$	310	1	9.2, 9.2, 17.2	//0.51	8902
4	75 POPE:25 POPG//75 POPE:25 POPG	10	Na^+/Cl^-	310	1	8.2, 8.2, 13.2	0.67	4969
5	72 ЛПС//180 DPPE	1	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Cl}^-$	310	0.4 x 36 окон зонтичной выборки	11.3, 8.2, 18.3	1.29//0.51	9775
6	75 POPE:25 POPG//75 POPE:25 POPG	1	Na^+/Cl^-	310	0.4 x 31 окна зонтичной выборки	8.2, 8.2, 13.2	0.67	4969
7	72 ЛПС//180 DPPE	10	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Cl}^-$	350	60	11.7, 8.5, 18.6	1.38//0.55	9165
8	72 ЛПС//180 DPPE	10	Na^+/Cl^-	350	30	11.6, 8.4, 17.7	1.35//0.54	9159
9	25 ЛПС:73 DPPE//169 DPPE	10	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Cl}^-$	350	40	9.4, 9.4, 17.7	-//0.52	8902
10	72 ЛПС//180 DPPE	1+10	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Cl}^-$	350	10	11.7, 8.6, 18.1	1.39//0.56	8886

В случае систем ЛПС // DPPE и POPE:POPG молекулы ZnPc^{8+} легко адсорбировались на внешнем ЛПС монослое мембраны состава ЛПС // DPPE и на обоих монослоях мембраны состава POPE:POPG в течение первых 100 нс МД расчетов. Для модельной системы ЛПС // DPPE связывание ZnPc^{8+} с внутренним монослоем фосфолипидов DPPE не наблюдалось (рисунок 3.2.1 А).

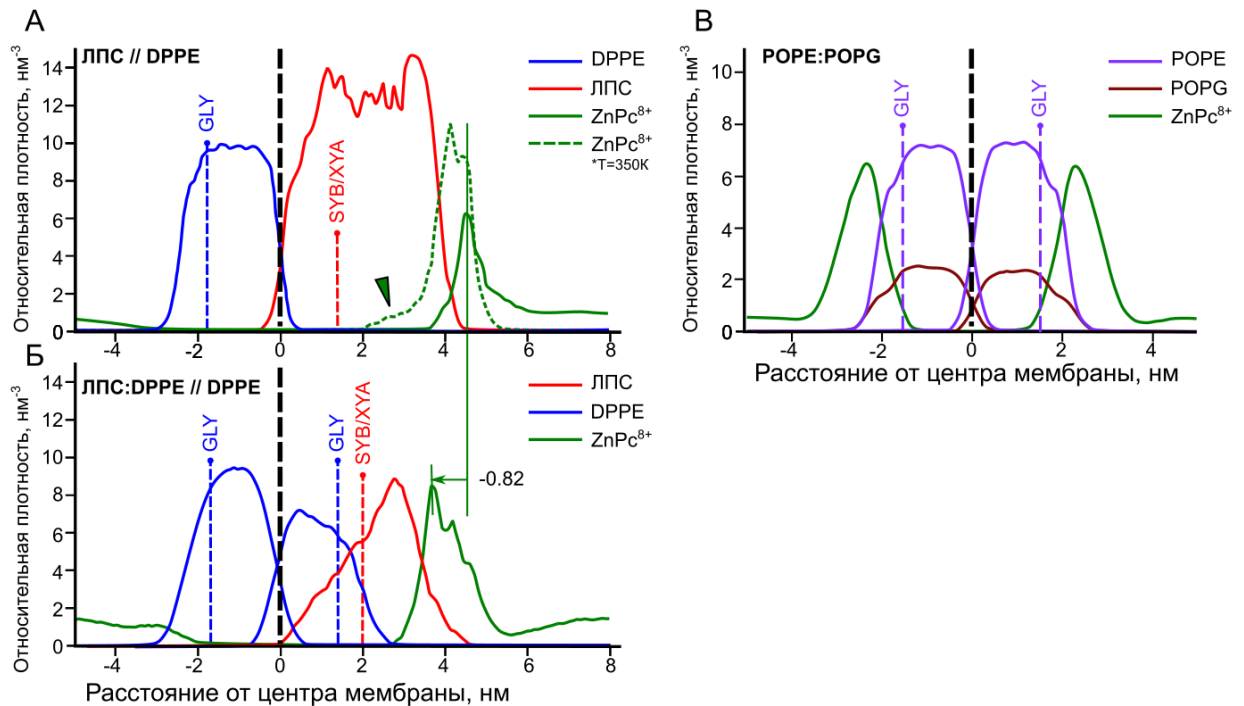


Рисунок 3.2.1 – Профили плотности компонентов молекулярных систем вдоль нормали к бислою для мембран различного состава в присутствии молекул ZnPC^{8+} . (А) Профили плотности для асимметричного бислоя ЛПС // DPPC. Кривые для ZnPC^{8+} рассчитанные по 1 мкс (сплошная линия) и по последним 15 мкс продленного МД расчета, проведенного при 350 К (пунктирная линия). Жирной зеленой стрелкой обозначено более глубокое проникновение ZnPC^{8+} в коровую часть. Профили плотности для ЛПС // DPPC бислоя с включением фосфолипидов в ЛПС монослой, рассчитанные по последним 15 мкс продленного МД расчета (Б), POPE:POPG (В) бислоев, рассчитанные по 1 мкс начального МД расчета. Границы гидрофобных областей бислоев показаны пунктирными линиями (в ЛПС-содержащих мембранах это усредненные положения КЗ частиц SYB / XYA, соответствующих диглюкозамину липида А; в липид-содержащих мембранах это КЗ частицы GLY, соответствующие глицерину в составе липидов POPE, POPG, DPPC); центры бислоевых мембран обозначены жирными черными линиями

Связывание ZnPC^{8+} с бислоем ЛПС // DPPC должно происходить как многоступенчатый процесс из-за необходимости замещения ZnPC^{8+} двухвалентных катионов, стабилизирующих ЛПС монослой. В проведенных МД расчетах длительностью 1 мкс этот процесс не мог происходить в полном объеме. Поэтому расчеты МД были продлены вплоть до 60 мкс и температура была увеличена до 350 К, чтобы улучшить выборку и ускорить кинетику проникновения ZnPC^{8+} в модельный ЛПС бислой. В данных

вычислительных экспериментах наблюдалось ступенчатое проникновение одиночной молекулы ZnPc^{8+} в коровую часть шероховатого бислоя, начиная примерно с 25 мкс (рисунок 3.2.2 А). Общее расстояние, пройденное этой молекулой ZnPc^{8+} , по отношению к среднему положению адсорбированных на поверхности молекул ZnPc^{8+} , составило 1,2 нм в конце МД расчета. Перемещение молекулы ZnPc^{8+} внутрь коровой части ЛПС монослоя произошло скачкообразно, что означает замедление этого процесса за счет вытеснения связанных ионов.

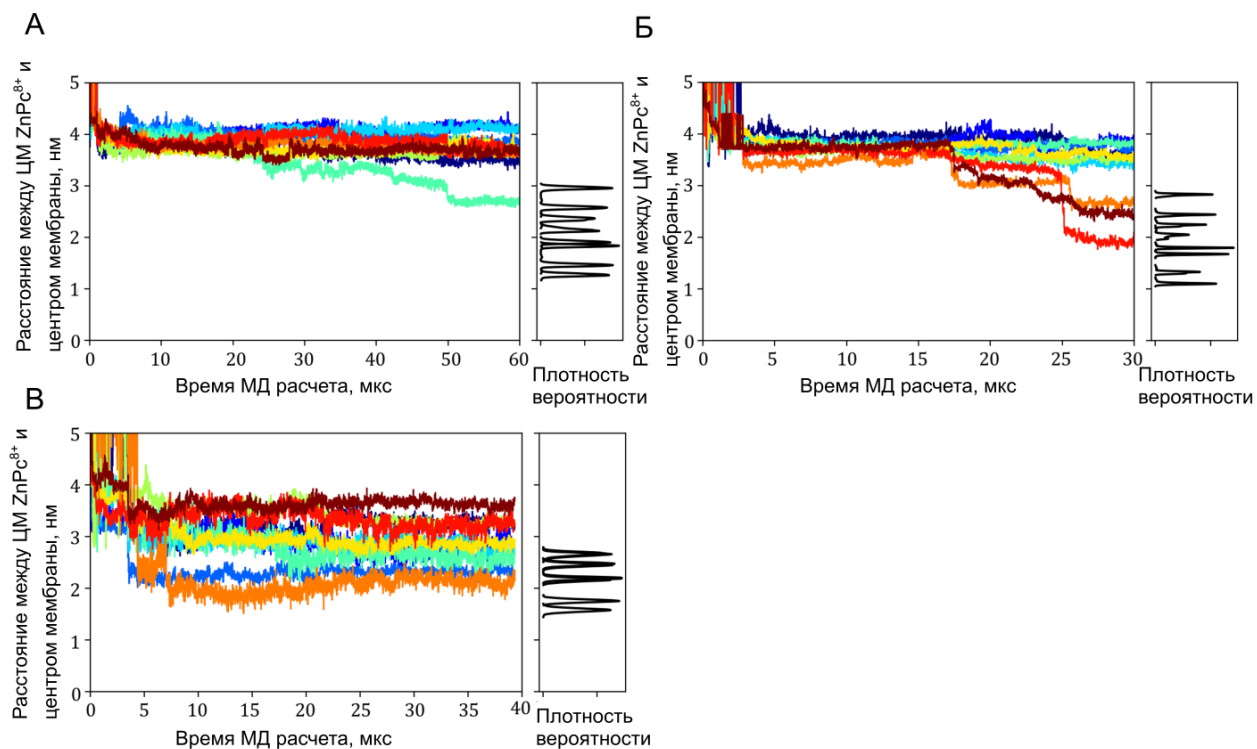


Рисунок 3.2.2 — Динамика проникновения ZnPc^{8+} в бислой ЛПС // DPPE, нейтрализованный катионами Ca^{2+} (А) и Na^{+} (Б), и бислой ЛПС:DPPE // DPPE с противоионами Ca^{2+} (В). Разными цветами показаны временные зависимости расстояния между центрами масс 10 молекул ZnPc^{8+} и гидрофобным ядром мембраны вдоль нормали к бислою (слева на каждой панели). Гистограммы положений заряженных КЗ частиц ЛПС относительно гидрофобной части мембраны вдоль нормали к бислою показаны справа на каждой панели

Чтобы продемонстрировать существенную роль двухвалентных катионов для кинетики проникновения ZnPc^{8+} внутрь ЛПС мембраны, был проведен дополнительный МД расчет идентичной системы состава ЛПС // DPPE с добавлением 10 молекул ZnPc^{8+} , но с заменой всех ионов Ca^{2+} на соответствующее количество ионов Na^{+} . В этом случае наблюдалось общее повышение скорости проникновения ZnPc^{8+} : молекулы ZnPc^{8+}

начинали входить в коровую область ЛПС только в течение первых 5 мкс МД расчета, при этом всего три молекулы ZnPc^{8+} прошли расстояние 1,4-2,0 нм к концу расчета длительностью 30 мкс (Рисунок 3.2.2 Б). Ускорение проникновения молекул ZnPc^{8+} сопровождалось увеличением латеральной диффузии молекул ЛПС более чем в 2 раза (таблица 3.2.2).

Таблица 3.2.2 – Коэффициенты латеральной диффузии, рассчитанные для ЛПС // DPPE систем, нейтрализованных катионами Ca^{2+} и Na^{+}

Система	$D_{\text{ЛПС}}, 10^{-10} \text{ см}^2/\text{с}$	$D_{\text{DPPE}}, 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$
ЛПС//DPPE + Ca^{2+}	0.82	1.21
ЛПС//DPPE + Na^{+}	1.93	1.18

Еще большее ускорение связывания было достигнуто при исследовании бислоя состава ЛПС // DPPE с добавлением фосфолипидов в ЛПС монослой. Молекулы DPPE и ЛПС имели тенденцию к сегрегации и формированию доменов. Первые молекулы ZnPc^{8+} встроились в ЛПС всего через 2-3 мкс с начала расчета (рисунок 3.2.2 В), тогда как большее количество молекул ZnPc^{8+} проникло еще глубже (рисунок 3.2.1 В), внутрь ЛПС домена по сравнению с предыдущими расчетами с чистым монослоем ЛПС. Поскольку продленные МД расчеты по адсорбции ZnPc^{8+} проводились при повышенных температурах, было приблизительно оценено время первоначального прохождения для начальной стадии встраивания ZnPc^{8+} в ЛПС монослой при физиологической температуре. Данная величина была оценена с использованием эмпирического закона Вант-Гоффа (скорость реакции увеличивается в 2-4 раза при повышении температуры на каждые 10 °C) и составила порядка 1-25 мс для системы ЛПС // DPPE с противоионами Ca^{2+} , 0.1-5 мс для ЛПС // DPPE с противоионами Na^{+} и 0.05-2 мс для системы ЛПС:DPPE // DPPE.

Важно отметить, что в настоящей работе было проведено исследование взаимодействия ZnPc^{8+} с бислоями ЛПС // DPPE с ЛПС шероховатого типа. Присутствие О-антигенов может препятствовать адсорбции ZnPc^{8+} на внешнюю мембрану бактерий. В то же время шероховатые ЛПС часто синтезируются в составе наружных мембран бактерий, особенно *Pseudomonas sp.* Большинство штаммов *P. aeruginosa* наряду с ЛПС с полным О-специфическим антигеном содержат ЛПС с гомополимерным СРА, шероховатые ЛПС без антигенных цепей, либо полужероховатые с одним

повторяющимся фрагментом О-специфического полисахарида [Lam, 2011]. При этом *P. aeruginosa* PAO1 полностью теряет свою способность синтезировать О-специфический антиген при повышенных температурах [Kropinski, 1987; Makin, 1996]. Таким образом, изучение адсорбции ZnPc^{8+} и проникновения через мембраны, содержащие в своем составе шероховатые ЛПС *P. aeruginosa* является необходимым первым шагом для понимания механизмов фотодинамической инактивации *P. aeruginosa* и чувствительности клинических изолятов и компонентов биопленок к фотосенсибилизации в зависимости от структуры ЛПС.

*Профили свободной энергии для транслокации ZnPc^{8+} через модельные мембраны
различного состава*

Несмотря на явную тенденцию ZnPc^{8+} проникать в ЛПС монослой, этот процесс происходит за миллисекунды при комнатной температуре, что делает затруднительным его исследование в равновесных МД расчетах при комнатной температуре. Чтобы преодолеть это ограничение и оценить термодинамические параметры транслокации ZnPc^{8+} через модельные мембраны, был применен МД метод зонтичной выборки, который зарекомендовал себя как мощный инструмент для выявления молекулярных деталей взаимодействия малых молекул с биологическими мембранами. В данном исследовании были получены профили свободной энергии для процесса транслокации ZnPc^{8+} через ЛПС // DPPE и POPE:POPG бислои.

По профилям свободной энергии для системы POPE:POPG (Рисунок 3.2.3 А) показано, что для ZnPc^{8+} существует значительный энергетический барьер для пересечения такого бислоя. Однако на расстоянии около 1,4 нм от центра мембраны на профиле свободной энергии наблюдается энергетический минимум около $15 \text{ } kT$, который возникает из-за электростатического притяжения противоположно заряженных полярных голов липидов POPG и молекулы ZnPc^{8+} и соответствует процессу адсорбции, наблюдаемому в равновесном МД расчете.

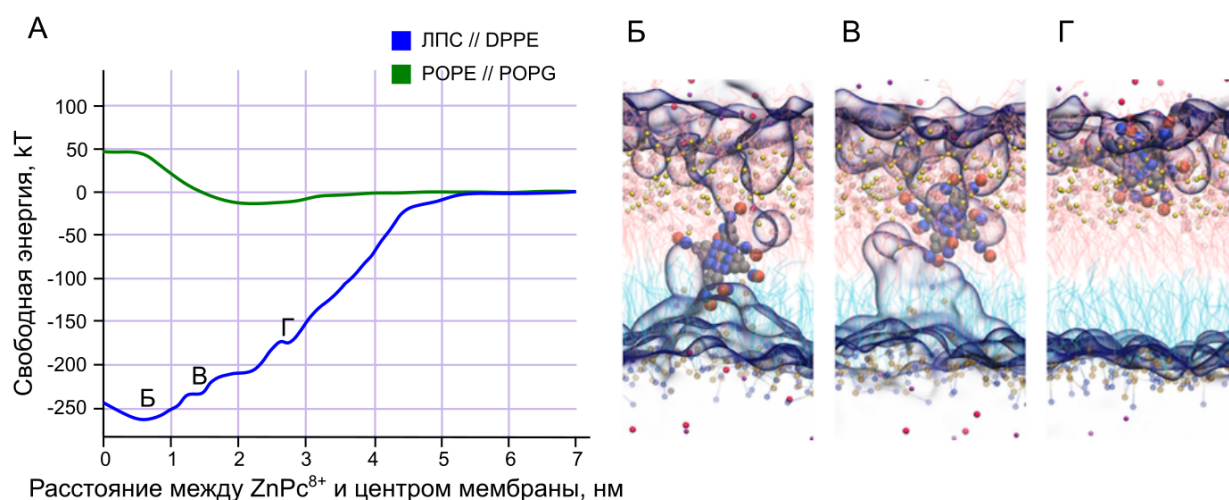


Рисунок 3.2.3 – Профили свободной энергии для перемещения молекулы ZnPc^{8+} из водного раствора к центру бислоя. (Б-Г) Кадры МД расчетов, демонстрирующие положение молекулы ZnPc^{8+} относительно ЛПС // DPPC, и соответствующие участкам на профиле свободной энергии. Характерное положение молекулы ZnPc^{8+} на расстоянии 0,6 нм относительно центра бислоя (Б), соответствующее глобальному минимуму энергии, и на расстояниях 1,4 нм (В) и 2,8 нм (Г) относительно центра бислоя, соответствующих локальным минимумам энергии. Молекулы липидов DPPC показаны голубым, ЛПС – розовым. КЗ частицы, соответствующие отрицательно заряженным фрагментам ЛПС, показаны розовыми сферами. КЗ частицы, соответствующие остаткам холина и фосфатам липидов DPPC, – в виде охристых и синих сфер. Молекула ZnPc^{8+} показана в виде синих, серых и красных сфер увеличенного диаметра; ионы Na^+ , Ca^{2+} и Cl^- показаны в виде фиолетовых, желтых и ярко-красных сфер; вода показана в виде фиолетовой полупрозрачной поверхности

В отличие от фосфолипидного бислоя процесс транслокации ZnPc^{8+} внутрь мембраны ЛПС // DPPC является энергетически выгодным (рисунок 3.2.3). Глобальный минимум профиля свободной энергии расположен всего на 0,5 нм от центра гидрофобной плоскости бислоя, что указывает на то, что ZnPc^{8+} может спонтанно проникать в центр мембраны ЛПС // DPPC, что приводит к ее серьезному искажению и образованию водной поры, пронизывающей весь бислой.

Формирование непрерывной и стабильной водной поры происходило, когда расстояние между ZnPc^{8+} и центром мембраны было меньше или равно 1,8 нм, на что указывают профили плотности воды (рисунок 3.2.4), рассчитанные вдоль нормали к бислою.

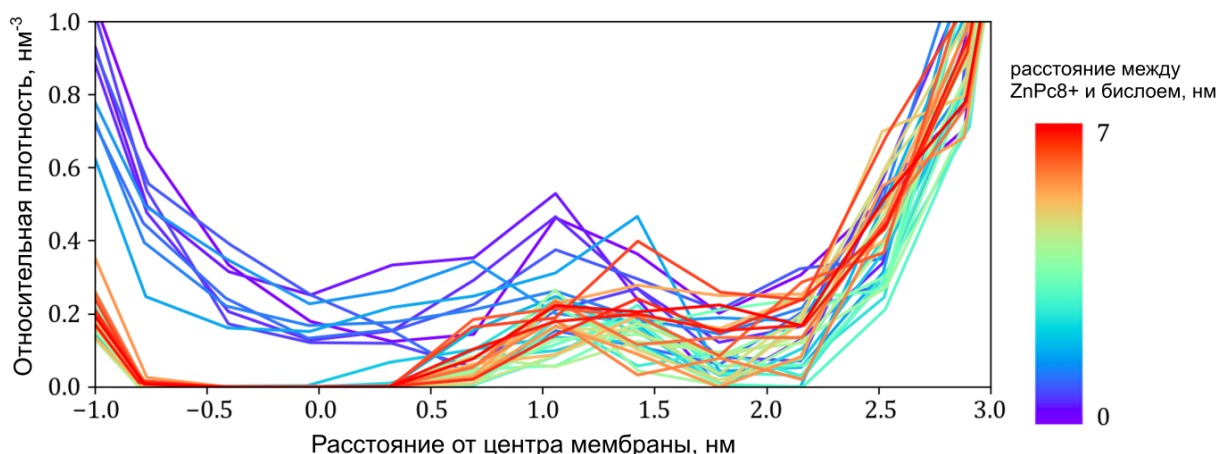


Рисунок 3.2.4 – Профили относительной плотности воды, рассчитанные для всех окон при расчетах зонтичной выборки. Разными цветами обозначены профили, рассчитанные для разных окон зонтичной выборки (всего 36 окон с расстоянием между ZnPc^{8+} и центром масс гидрофобной области бислоя ЛПС: DPPE, изменяющимся от 0 до 7 нм)

Профиль свободной энергии для транслокации ZnPc^{8+} внутрь мембраны ЛПС // DPPE также имеет два локальных минимума при 2,7 и 1,4 нм. Эти минимумы соответствуют промежуткам между средними положениями заряженных КЗ частиц молекул ЛПС (рисунок 3.2.2 А). Уходы из этих областей, вероятно, связаны с общим искажением ЛПС монослоя и разрывом связей между соседними молекулами ЛПС, соединенными мостиками Ca^{2+} , что приводит к локальному увеличению свободной энергии и ступенчатому характеру проникновения ZnPc^{8+} .

Описанный выше механизм проникновения ZnPc^{8+} имеет сходство с механизмом, предложенным ранее для циклических пептидных антибиотиков полимиксинов [Berglund, 2015; Zhang, 2000]. Также было обнаружено, что кинетика проникновения ZnPc^{8+} в значительной степени определяется типом противоионов, стабилизирующих ЛПС монослой внешней мембраны. Замена двухвалентных противоионов на одновалентные ускоряет перемещение ZnPc^{8+} к центру мембраны. Аналогичным образом, для полимиксинов связывание с ЛПС монослоями ингибируется ионами Mg^{2+} , что указывает на конкурентные взаимодействия органических поликатионных соединений и двухвалентных катионов.

Механизм самоиндуцируемого проникновения $ZnPc^{8+}$

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, были проведены дополнительные МД расчеты длительностью 10 мкс, начиная с конформации, соответствующей глобальному минимуму профиля свободной энергии (заключительный кадр соответствующей траектории зонтичной выборки, похожий на показанный на рисунке 3.2.3 Б), с добавлением 10 дополнительных молекул $ZnPc^{8+}$, размещенных случайным образом в реакционной ячейке. В ходе расчета все молекулы $ZnPc^{8+}$ адсорбировались на ЛПС монослой в течение первых 5 мкс (рисунок 3.2.5 А, Б). Затем одна из молекул $ZnPc^{8+}$ перемещалась к центру мембраны в течение 2,5 мкс, при этом меняя свою ориентацию с преимущественно параллельной поверхности мембраны на перпендикулярную (рисунок 3.2.5 В, Г). Во время этого процесса проникновения молекула $ZnPc^{8+}$ следовала контуру предварительно сформированной поры, что свидетельствует о том, что даже локальные дефекты в ЛПС монослое могут ускорить проникновение гидрофильных частиц.

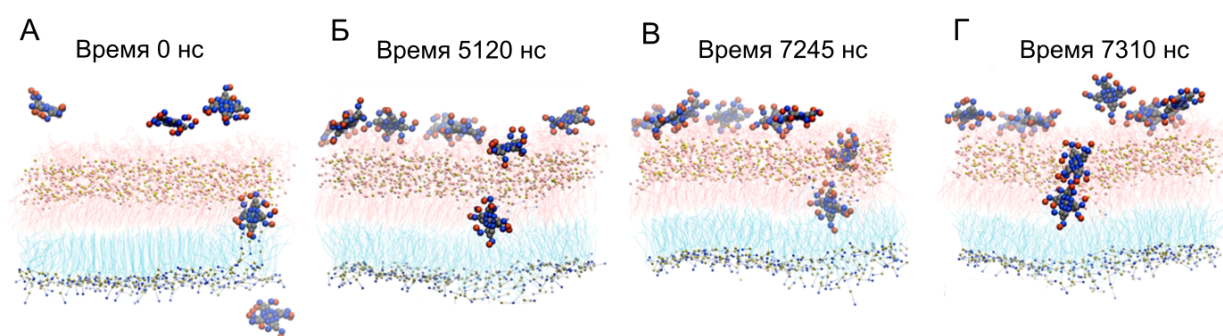


Рисунок 3.2.5 – Самоиндуцируемое проникновение молекул $ZnPc^{8+}$. (А-Г) Кадры МД расчета, описывающие процесс проникновения $ZnPc^{8+}$ внутрь бислоя в разные моменты времени. Молекулы липидов DPPC показаны голубым, ЛПС – розовым. КЗ частицы, соответствующие отрицательно заряженным фрагментам ЛПС, показаны розовыми сферами. КЗ частицы, соответствующие остаткам холина и фосфатам липидов DPPC, – в виде охристых и синих сфер. Молекулы $ZnPc^{8+}$ показаны в виде синих, серых и красных сфер увеличенного диаметра. Ионы Ca^{2+} показаны в виде желтых сфер, вода и ионы Na^{+} и Cl^{-} не показаны”

3.3. Изучение взаимодействия катионных фотосенсибилизаторов с компонентами оболочки коронавирусов

Данный раздел написан с использованием материалов статей [Fedorov, 2021; Sharshov, 2021]. “Долгое время считалось, что противовирусные ФС должны связываться с липидной оболочкой вируса в случае оболочечных вирусов, или белками оболочки, или генома [Jockusch, 1996]. В коронавирусах в состав липидной оболочки входят, по крайней мере, три типа трансмембранных белков: М-, Е- и S-белки [Noman, 2021]. Наиболее представленные в липидной оболочке коронавирусов трансмембранные М- и Е-белки обладают короткими (19 и 16 аминокислотных остатков соответственно) N-концевыми эктодоменами. В то же время, каждый эктодомен тримерного S-белка SARS-CoV-2 содержит 1213 аминокислотных остатков из 1273 [Thomas, 2020]. Ненасыщенные жирные кислоты вирусных липидов чувствительны к синглетному кислороду, генерируемому связывающимися с мембранами ФС, такими как липофильное производное тиазолидина [Vigant, 2013]. Однако встраивание ZnPc^{8+} в липидный бислой вируса, происходящий из мембраны клетки-хозяина, маловероятно, поскольку мы в вычислительных экспериментах с применением крупнозернистой МД молекулы ZnPc^{8+} не показали сродства к модельному бислою из фосфатидилхолина (POPC). Детали вычислительных экспериментов представлены в таблице 3.3.1.

Таблица 3.3.1. Детали проведенных КЗ расчетов для изучения взаимодействия ZnPc^{8+} с фосфолипидным бислоем POPC.

#	Количество молекул POPC в бислое	Количество молекул ZnPc^{8+}	Ионы	Темп., К	Время, μs	Размеры расчетной ячейки (X,Y,Z), нм	Площадь на липид, nm^2	Кол-во КЗ частиц воды
1	200	10	Na^+/Cl^-	310	1	7.8, 7.8, 13.9	0.61	5231
2	200	1	Na^+/Cl^-	310	0.4 x 31 окна зонтичной выборки	7.8, 7.8, 14.2	0.61	5231

Как видно из профиля свободной энергии, для проникновения ZnPc^{8+} через такую мембрану существует значительный энергетический барьер. Также при 3,2 нм на профиле свободной энергии наблюдается неглубокий максимум $\sim 2 \text{ кТ}$ при 3,2 нм, что

соответствует разрушению гидратной оболочки вокруг молекулы ZnPc^{8+} при достижении бислоя (рисунок 3.3.1 А). Действительно, в соответствующем равновесном МД расчете длительностью 1 мкс молекулы ZnPc^{8+} не проникали к центру модельного бислоя, располагаясь на расстояниях не менее 3,5 нм от центра бислоя (рисунок 3.3.1 Б). Таким образом, из представленных результатов следует, что мембраны оболочечных вирусов, происходящие из мембран животных клеток, обогащенные нейтральными липидами, слабо связывают поликатионные красители.

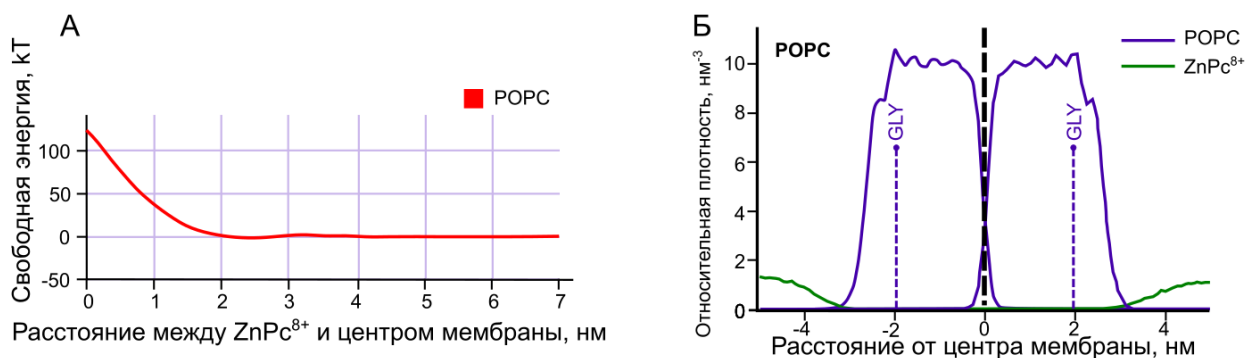


Рисунок 3.3.1. Взаимодействие ZnPc^{8+} с модельным POPC бислоем. (А) Профили плотности для POPC бислоя в присутствии ZnPc^{8+} . Границы гидрофобных областей, соответствующие остаткам глицерина в составе липидов POPC, показаны пунктирными фиолетовыми линиями; центр бислоевой мембраны обозначен жирной черной линией. (Б) Профиль свободной энергии для перемещения молекулы ZnPc^{8+} из водного раствора к центру POPC бислоя

В то же время, в процессе фотодинамической инактивации оболочечных вирусов в присутствии октакатионного ZnPc^{8+} происходит деструкция как поверхностных белков, так и при больших дозах облучения – мембран вирионов [Korneev, 2019]. Как показано в данной совместной работе [Sharshov, 2021] нашими коллегами ФС ZnPc^{8+} проявляет высокую эффективность в инактивации коронавируса SARS-CoV-2.

Могут ли молекулы ZnPc^{8+} связываться с эктодоменами S-белков, выступающими из вирусной мембраны? Чтобы ответить на этот вопрос, сначала было рассчитано электростатическое потенциальное поле S-белка и ZnPc^{8+} в соответствии с формализмом Пуассона–Больцмана. На рисунке 3.3.2 показано поверхностное распределение электростатического потенциала и эквипотенциальных электростатических поверхностей S-белка SARS-CoV-2 (А, Б) и ZnPc^{8+} (В) при ионной силе 100 мМ. В то время как молекула ZnPc^{8+} в основном заряжена положительно, для «ноги» S-белка продемонстрировано наличие трех больших областей отрицательного

электростатического потенциала. Самая большая отрицательно заряженная область расположена на соединении «головы» и «ноги» S-белка. «Голова» S-белка в целом заряжена положительно, хотя на ней присутствует несколько участков отрицательного потенциала. Также показано, что распределение электростатического потенциала не является строго симметричным (рисунок 3.3.2 Б).

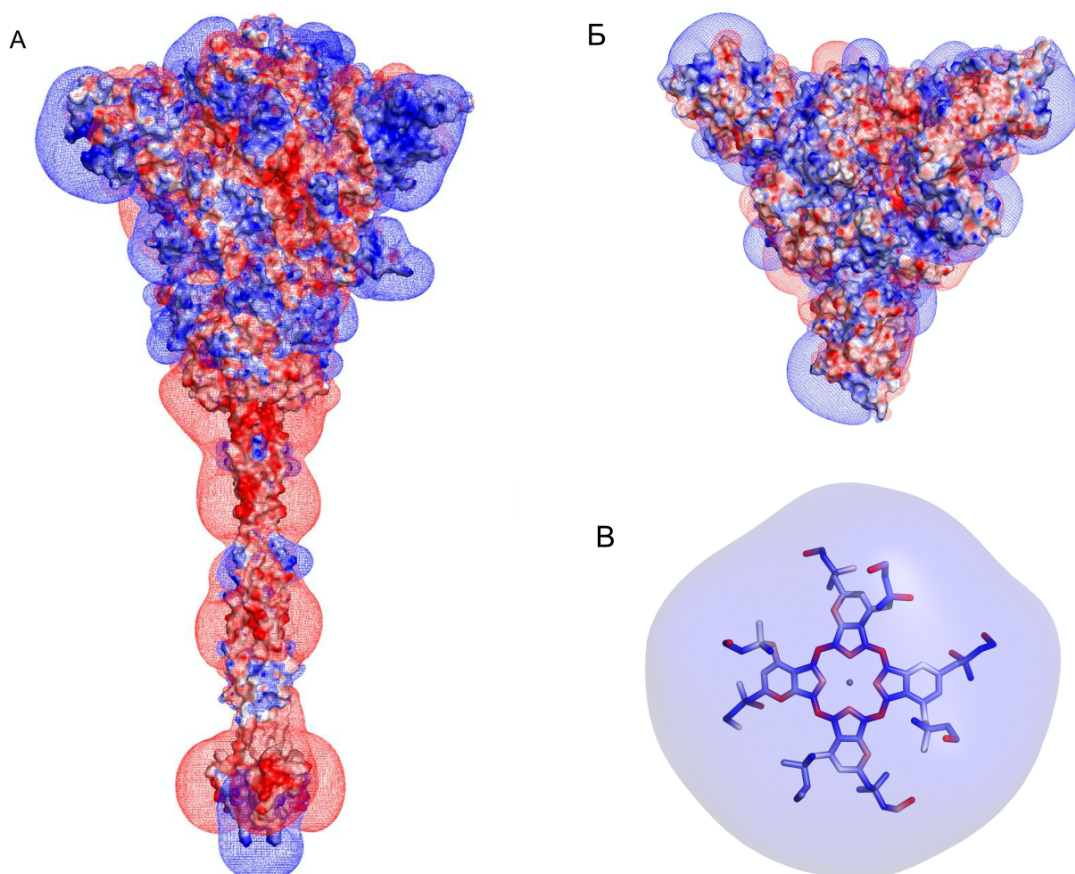


Рисунок 3.3.2 – Распределение электростатического потенциала на поверхности S-белка SARS-CoV-2 от -100 мВ (красный) до $+100$ мВ (синий), и его эквипотенциальные электростатические поверхности, представленные в виде красной (-7 мВ) и синей сетчатых поверхностей ($+7$ мВ) – вид сбоку (А) и сверху (Б). (В) Трехмерная структура ZnPc^{8+} , окрашенная в соответствии с поверхностным электростатическим потенциалом от -100 мВ (красный) до $+100$ мВ (синий)

Поскольку молекулы ZnPc^{8+} и определенные области S-белка SARS-CoV-2 обладают противоположными зарядами, для них с большой вероятностью характерно электростатическое взаимодействие. Чтобы это проверить, было получено несколько тысяч структур диффузионно-столкновительных электростатически выгодных комплексов ZnPc^{8+} с S-белком SARS-CoV-2 с использованием методов БД. Молекулы ZnPc^{8+}

связывались с определенными областями на поверхности S-белка с энергией электростатического притяжения, превышающей 8 kT (рисунок 3.3.3 А). Для анализа множества полученных структур был применен иерархический кластерный анализ, в результате чего было выявлено восемь ансамблей энергетически выгодных комплексов. Большинство молекул ZnPc^{8+} (82.4 %) формировали шесть кластеров вокруг верхней половины «ноги» S-белка, где расположена обширная область отрицательного электростатического потенциала, притягивающая положительно заряженные молекулы ФС. Остальные 17.6 % структур входили в состав двух кластеров, расположенных в двух областях отрицательного электростатического потенциала на «голове» S-белка SARS-CoV-2.

Последующие расчеты БД с пороговым значением энергии электростатического притяжения ZnPc^{8+} к SARS-CoV-2 равным 11 kT позволили найти наиболее энергетически выходные положения данного ФС относительно спайкового белка. В этом случае в результате применения кластерного анализа было выявлено только три кластера энергетически выгодных структур (рисунок 3.3.3 Б). Все молекулы связывались на соединении «ноги» и «головы» S-белка SARS-CoV-2, где расположено довольно много отрицательно заряженных аминокислот. Эта область в увеличенном масштабе вместе с центральными структурами кластеров ZnPc^{8+} показана на увеличенной вставке. Также было обнаружено, что при энергии электростатического притяжения не более 8 kT электростатические взаимодействия со спайковым белком позволяют молекуле ZnPc^{8+} практически свободно вращаться вокруг своего центра масс в непосредственной близости отрицательно заряженных аминокислотных остатков S-белка. В то же время при энергии электростатического притяжения 11 kT возможны только определенные ориентации молекул ZnPc^{8+} относительно S-белка. При пороговом значении энергии электростатического притяжения, превышающем 12 kT , диффузионно-столкновительные комплексы не образовывались даже в миллисекундном расчете.

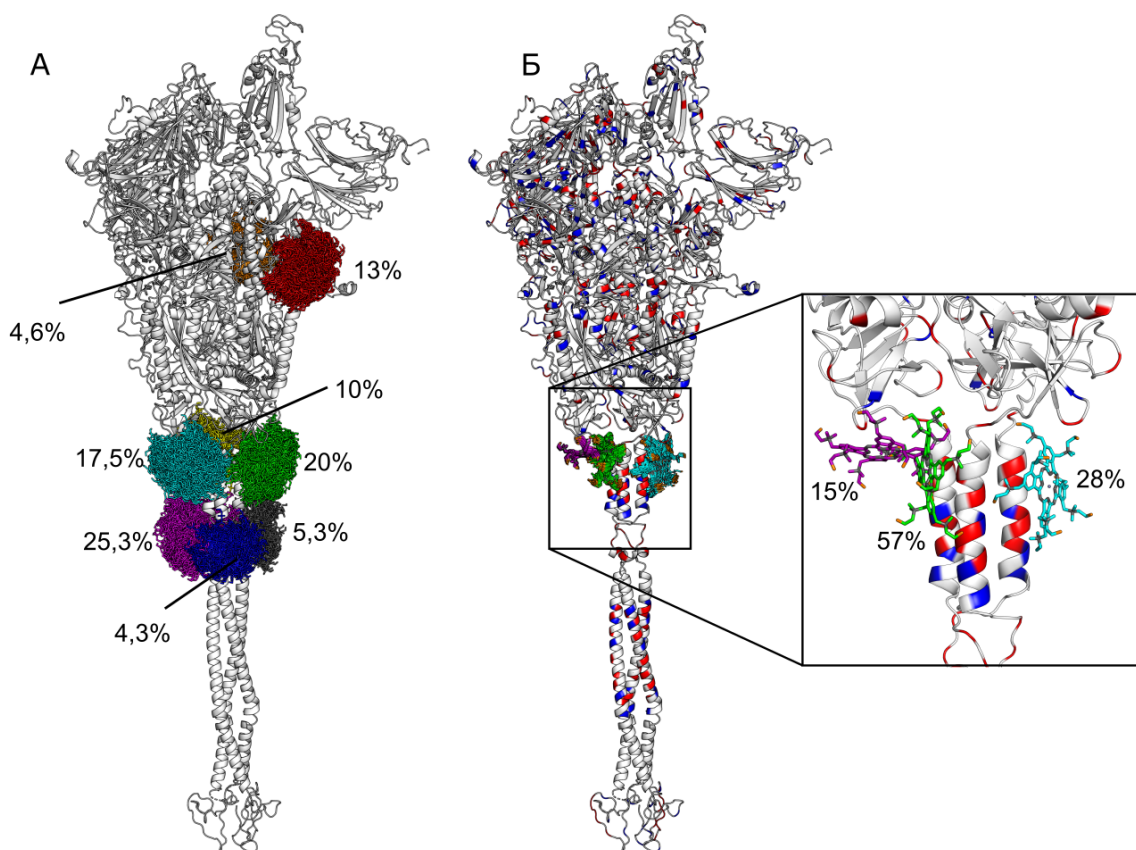


Рисунок 3.3.3 – Трехмерная структура спайкового белка SARS-CoV-2 с кластерами молекул ZnPc^{8+} с энергией электростатического притяжения к спайковому белку SARS-CoV-2, превышающей 8 kT (А) и 11 kT (Б). Структуры молекул ZnPc^{8+} , принадлежащие одному кластеру, показаны одним цветом. Относительные размеры кластеров в процентах приведены на рисунке. Положительно заряженные аминокислоты лизин и аргинин S-белка показаны синим, отрицательно заряженные глутамат и аспартат – красным (Б). На вставке показана увеличенная область спайкового белка SARS-CoV-2 с центральными структурами ZnPc^{8+} трех кластеров

Таким образом, было показано, что наиболее стабильное связывание ZnPc^{8+} происходит на соединении «головы» и «ноги» S-белка на расстоянии около 10 нм от мембраны. ZnPc^{8+} представляет собой ФС типа II с высоким квантовым выходом образования $^1\text{O}_2$ – 0,65 [Makarov, 2007]. В водной среде время жизни $^1\text{O}_2$ составляет около 4 мкс, но в биологических средах оно сокращается. В клетках время жизни $^1\text{O}_2$ находится в диапазоне 10–320 нс, а его диффузионный пробег составляет 10–55 нм [Agostinis, 2011]. По мнению некоторых авторов [Moan, 1991], $^1\text{O}_2$ имеет еще более ограниченное время жизни и диффузионный пробег – 40 нс и 20 нм соответственно. Таким образом, для эффективного окислительного повреждения ФС должен находиться относительно

чувствительных к фотоокислению биологических структур на расстоянии, не превышающем радиус диффузии $^1\text{O}_2$. С точки зрения аФДТ это означает, что адгезия ФС к поверхностным структурам патогена-мишени должна быть достаточной для его разрушения [Almeida, 2020].

Обнаруженное связывание ZnPc^{8+} на соединении «головы» и «ноги» S-белка на расстоянии около 10 нм от мембраны означает, что структурами, чувствительными к фотоокислению, являются как поверхностные белки, так и липидный бислой. Это согласуется с экспериментальными данными о том, что ZnPc^{8+} вызывает фотодинамическую инактивацию вирусов птичьего гриппа А подтипов H5N1 [Kuznetsova, 2009] и H5N8 [Korneev, 2019]. После инкубации H5N8 с $4 \mu\text{M}$ ZnPc^{8+} и при облучении белым светом при дозе 12 Дж/см^2 происходит три различных типа повреждения H5N8 и образуются: (1) «лысые» вирионы с удаленными поверхностными гликопротеинами и мембранами, сохранившими структурную целостность; (2) вирионы с поврежденными мембранами; (3) и полностью разрушенные вирионы. При этом все три формы не являются инфекционными [Korneev, 2019].

Также преимущественное связывание ZnPc^{8+} с S2 субъединицей на соединении «головы» и «ноги» S-белка позволяет предположить, что ZnPc^{8+} , по-видимому, не влияет на прикрепление SARS-CoV-2 к клетке-хозяину и ее инфицирование, поскольку эта область напрямую не участвует во взаимодействии с рецептором ACE2. Экспериментальные данные подтверждают отсутствие антивирусной активности ZnPc^{8+} в отсутствие облучения. Действительно, как было показано в нашей совместной работе с ФИЦ ФТМ [Sharshov, 2021], ZnPc^{8+} не влиял на титр SARS-CoV-2 и только при облучении вызывал потерю инфекционности, то есть приводил к фотодинамической инактивации вируса. В отличие от ZnPc^{8+} метиленовый синий проявляет антивирусную активность по отношению к SARS-CoV-2 даже в отсутствие облучения [Bojadzic, 2021]. Закономерно предположить, что различие механизмов антивирусной активности ZnPc^{8+} и метиленового синего может быть обусловлено связыванием этих ФС с разными функциональными областями S-белка. Поэтому на следующем этапе исследования были изучены электростатические свойства S-белков трех коронавирусов SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV и взаимодействие с ними ZnPc^{8+} и метиленового синего.

На рисунке 3.3.4 показано поверхностное распределение электростатического потенциала S-белков SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, а также эквипотенциальные электростатические поверхности для метиленового синего при ионной силе 100 мМ. S-белки трех изученных коронавирусов обладают разным суммарным зарядом равным: -30

для SARS-CoV-2, -48 SARS-CoV, -50 для MERS-CoV. Суммарный заряд верхнего NTD равен -4 для SARS-CoV, +2 для SARS-CoV-2 и -3 для MERS-CoV.

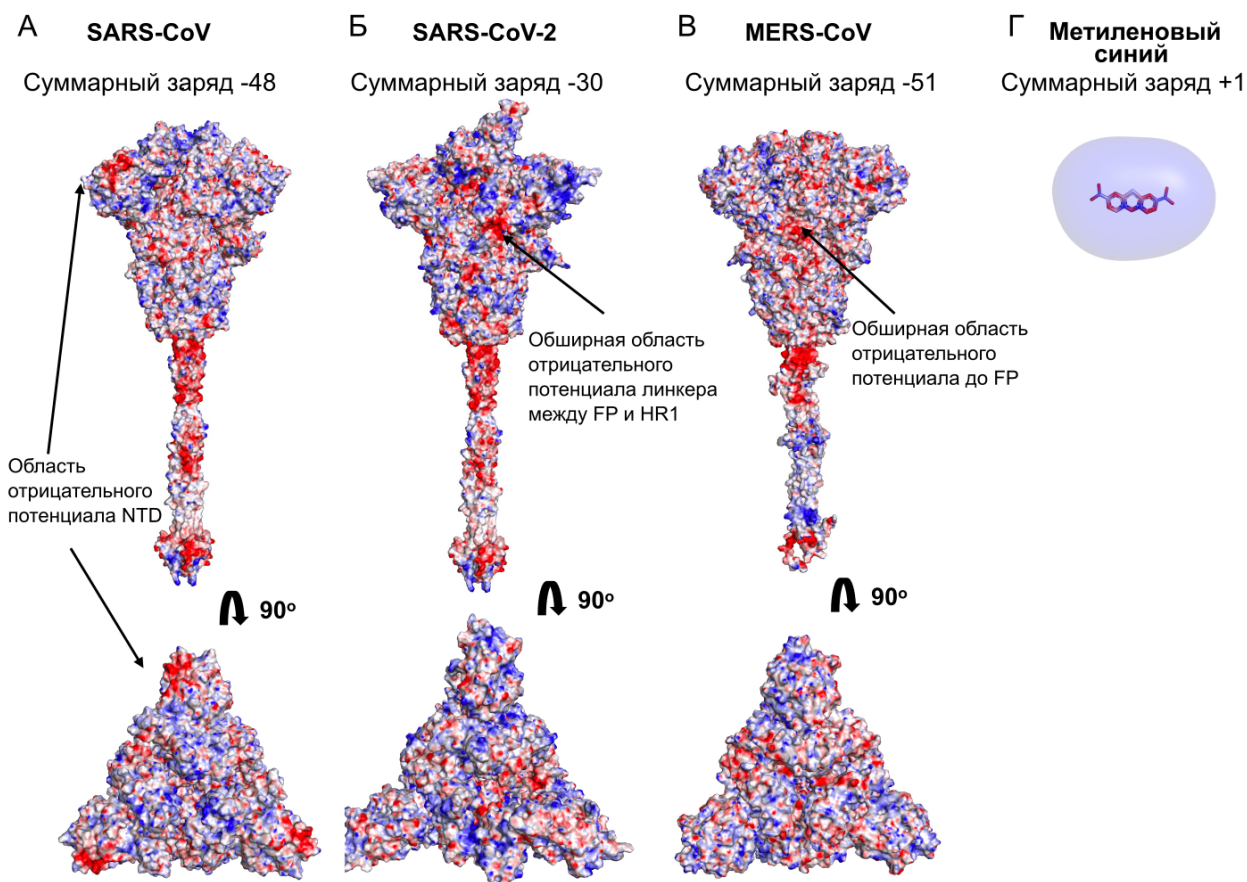


Рисунок 3.3.4 – Поверхностное распределение электростатического потенциала от -100 мВ (красный) до +100 мВ (синий) S-белков SARS-CoV (А), SARS-CoV-2 (Б) и MERS-CoV (В) вид сбоку (верхняя панель) и вид сверху (нижняя панель). Трехмерные структуры фотосенсибилизаторов ZnPc^{8+} (Г) и метиленового синего (Д) с эквипотенциальными электростатическими поверхностями, окрашенными в красный (-7 мВ) и синий (+7 мВ) цвет

Показано, что на «ногах» S-белков SARS-CoV и SARS-CoV-2 присутствуют три обширных области отрицательного электростатического потенциала, наиболее протяженная из которых находится в районе соединения «ноги» и «головы» S-белка. На «ноге» S-белка MERS-CoV присутствуют только две таких области, одна из которых также находится в районе соединения «ноги» и «головы», а вторая — на цитоплазматическом домене. Электрический заряд на поверхности «голов» S-белков распределен очень гетерогенно. Тем не менее, области ярко выраженного отрицательного потенциала наблюдаются на «головах» всех трех коронавирусов. Наиболее выраженная

отрицательно заряженная область на поверхности NTD S-белка SARS-CoV генерируется остатками Asp15, Asp17, Asp23, Asp24, Asp134, Asp154, Asp243 и Glu131. Для двух других коронавирусов SARS-CoV-2 и MERS-CoV на поверхности NTD нет похожих отрицательно заряженных областей, что объясняется отсутствием некоторых соответствующих отрицательно заряженных аминокислот. В то же время на «голове» S-белка MERS-CoV присутствует обширная площадь отрицательного электростатического потенциала в линкерном участке между RBD и FP (аминокислотные остатки 676–686, 708–723 и 879–942). На S-белке SARS-CoV-2 присутствует аналогично расположенная отрицательно заряженная область, состоящая из аминокислотных остатков линкера между FP и HR1 доменами. Молекулы ФС, обладающие зарядами +1 в случае метиленового синего (рисунок 3.3.4 Г) и +8 в случае ZnPc^{8+} (рисунок 3.3.2 В), демонстрируют только положительные электростатические эквипотенциальные поверхности.

С помощью БД были проанализированы сайты связывания ZnPc^{8+} и метиленового синего с S-белками SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV. Аминокислотные остатки, с которыми ФС формировали контакты, окрашены в соответствии с вероятностью связывания с ними молекул ФС и показаны на трехмерных (рисунки 3.3.5 и 3.3.6) и первичных (рисунок 3.3.7) структурах S-белков. Поскольку выбранный для данной работы S-белок SARS-CoV-2 в отличие от спайковых белков двух других коронавирусов представлен в виде гомотримера, два протомера которого находятся в «закрытом» состоянии и один – в «открытом», для SARS-CoV-2 первичная структура, представленная на рисунке 3.3.7, разделена на полосы, которые соответствуют «открытому» (рисунок 3.3.7 В1, Г1) и «закрытому» (рисунок 3.3.7 В2, Г2, В3, Г3) состояниям.

Так же, как было показано выше для взаимодействия ZnPc^{8+} с SARS-CoV-2, молекулы данного ФС формировали электростатические диффузионно-столкновительные комплексы с определенными областями на поверхности S-белков SARS-CoV и MERS-CoV. Для всех изученных коронавирусов была обнаружена общая обширная область отрицательного электростатического потенциала в районе соединения «голов» и «ног» S-белков. Данная область находилась на линкерном участке, связывающем HR1 и HR2 домены. При этом было показано, что для этой области практически нет разницы в связывании ФС с промерами в «открытом» и «закрытом» состояниях.

Аналогично связыванию ZnPc^{8+} с S-белком SARS-CoV-2, молекулы данного ФС формировали диффузионно-столкновительные комплексы с обширной областью отрицательного электростатического потенциала на «голове» S-белка MERS-CoV (рисунок 3.3.5 Г, верхняя панель), которая в первичной последовательности находится как раз перед FP (рисунок 3.3.7 Д). В отличие от SARS-CoV-2 и MERS-CoV, данная

отрицательно заряженная область отсутствует на S-белке SARS-CoV. Однако, на верхней части «головы» спайкового белка SARS-CoV присутствует область отрицательного электростатического потенциала в районе NTD (рисунки 3.3.4 А, 3.3.7 А, Б), с которой ZnPc^{8+} (рисунок 3.3.5 А) и метиленовый синий (рисунок 3.3.6 А) формируют электростатические контакты.

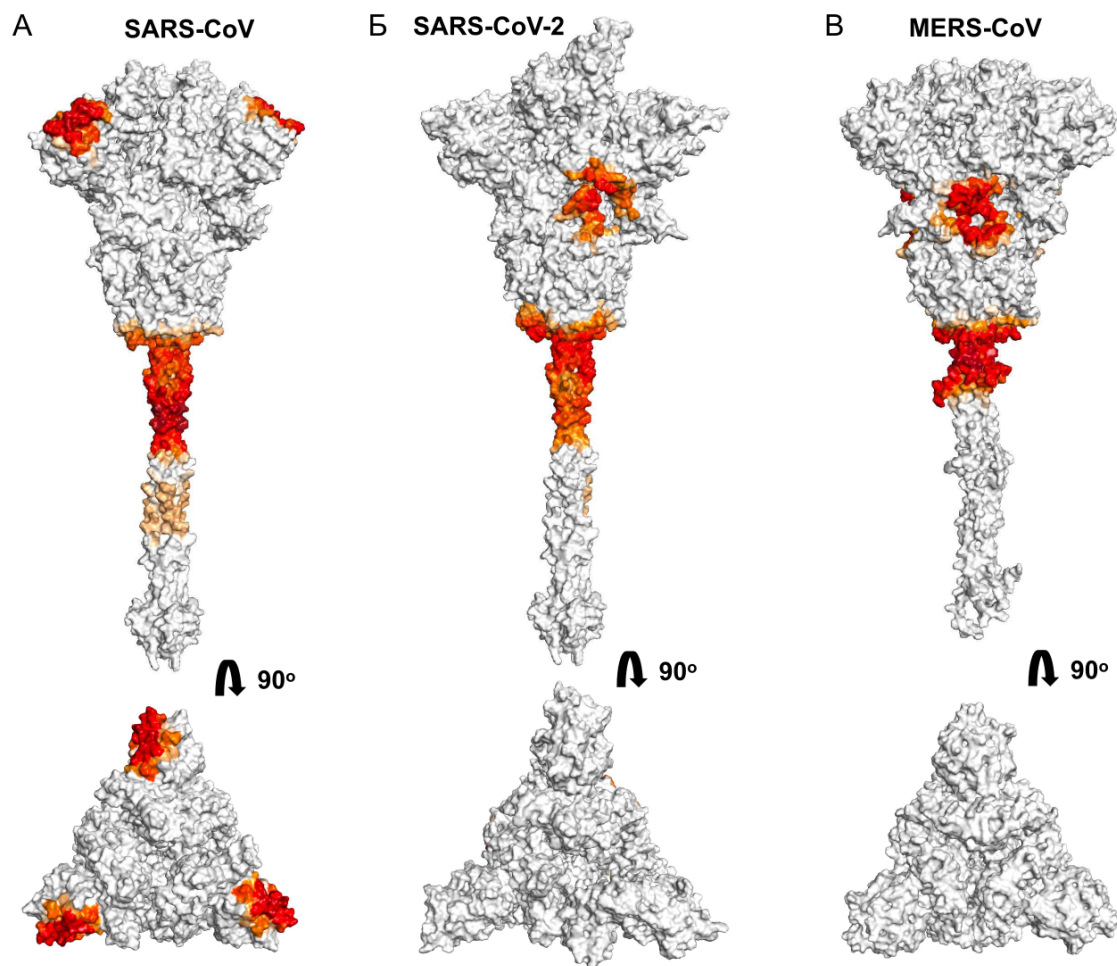


Рисунок 3.3.5 – S-белки коронавирусов SARS-CoV (А), SARS-CoV-2 (Б) и MERS-CoV (В) с отраженными на их поверхности областями связывания ZnPc^{8+} : вид сбоку – верхние панели, вид сверху – нижние панели. Области взаимодействия ФС с поверхностью S-белка окрашены по градиенту от оранжевого к красному в зависимости от вероятности контакта с ФС

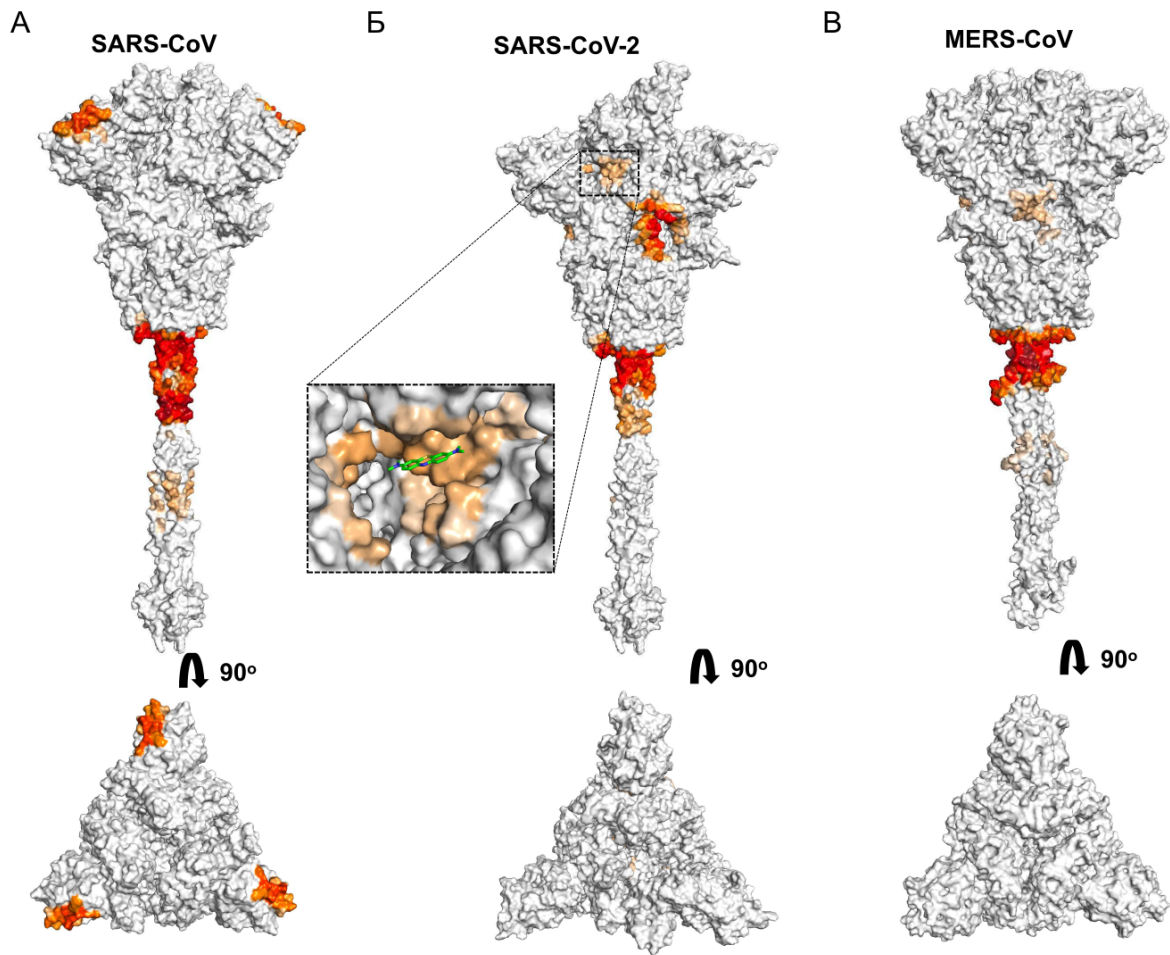


Рисунок 3.3.6 – S-белки коронавирусов SARS-CoV (А), SARS-CoV-2 (Б) и MERS-CoV (В) с отраженными на их поверхности областями связывания метиленового синего: вид сбоку – верхние панели, вид сверху– нижние панели. Области взаимодействия ФС с поверхностью S-белка окрашены по градиенту от оранжевого к красному в зависимости от вероятности контакта с ФС

Показано, что так же, как и ZnPc^{8+} , метиленовый синий способен связываться с областью отрицательного электростатического потенциала на поверхности S-белка SARS-CoV-2 (рисунок 3.3.6 Б). Также показано, что метиленовый синий с низкой вероятностью связывается со схожей областью на S-белке MERS-CoV (рисунок 3.3.6 В). Для протомеров S-белка SARS-CoV-2 в «открытом» и «закрытом» состоянии показана разная способность формировать контакты с молекулами ФС (рисунок 3.3.7 В, Г). Показано, что молекулы ZnPc^{8+} (рисунок 3.3.7 В2, В3) и метиленового синего (рисунок 3.3.7 Г2, Г3) способны связываться с упомянутой выше обширной областью отрицательного электростатического потенциала на «головах» протомеров спайкового белка, находящихся в «закрытом» состоянии. Данная область находится сразу после FP домена. Протомер S-белка в «открытом» состоянии в этой области с трудом связывает молекулы ФС.

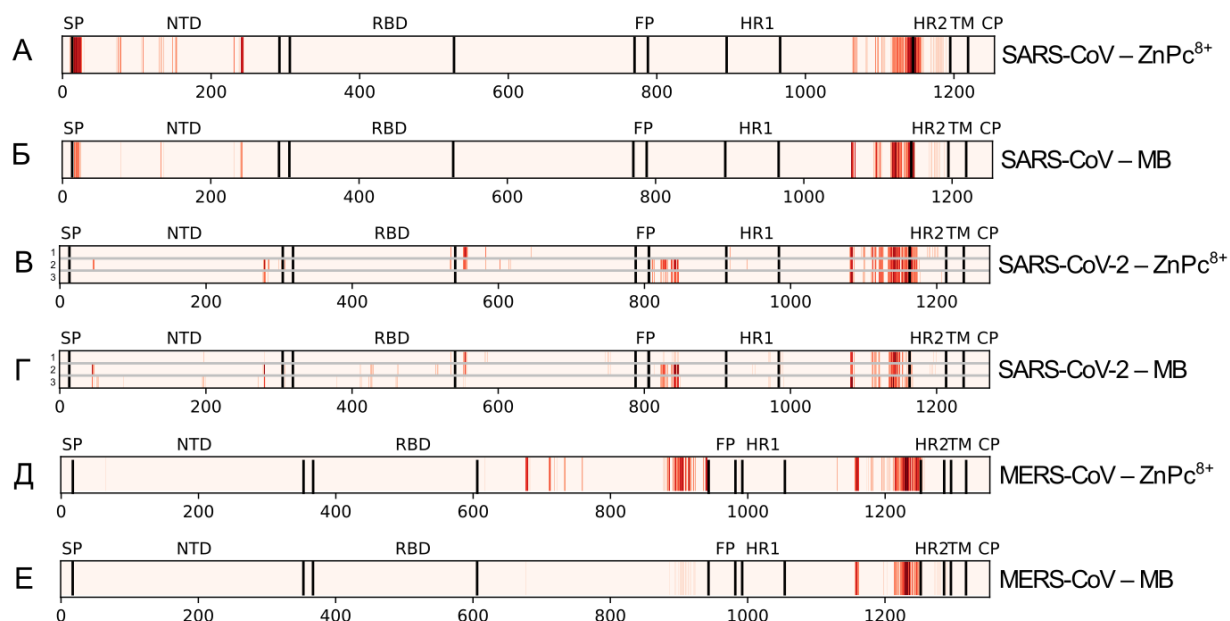


Рисунок 3.3.7 – Аминокислотные остатки первичных последовательностей SARS-CoV (А, Б), SARS-CoV-2 (В, Г) и MERS-CoV (Д, Е) с обозначением функциональных доменов, окрашенных в зависимости от вероятности связывания ФС. (В1, Г1) относятся к протомерам S-белка SARS-CoV-2 в «открытом» состоянии, а (В2, В3, Г2, Г3) - к протомерам S-белка в «закрытом» состоянии

Для того чтобы понять природу этого различия были проанализированы пространственные конформации различных аминокислотных остатков, создающих электростатический потенциал в этой области для протомеров в «открытом» и «закрытом» состояниях. Arg847 протомера в «открытом» состоянии экспонирован в раствор и экранирует отрицательно заряженные аминокислоты Asp830, Asp839, Asp848 этого же протомера, поэтому молекулы положительно заряженного ФС с трудом формируют электростатически выгодные комплексы с этой областью (рисунки 3.3.7 В1, Г1 и 3.3.8 Рисунок 3.3.8 А, Б). В «закрытом» состоянии Arg847 формирует водородные связи с D574, D568 и D586 соседнего протомера S-белка. Таким образом, Arg847 в этом случае не экранирован в раствор и не оказывает такой сильный экранирующий эффект на отрицательное электростатическое поле этой области (рисунок 3.3.8 В, Г) и связывание молекул ФС (рисунок 3.3.7 В2, В3, Г2, Г3).

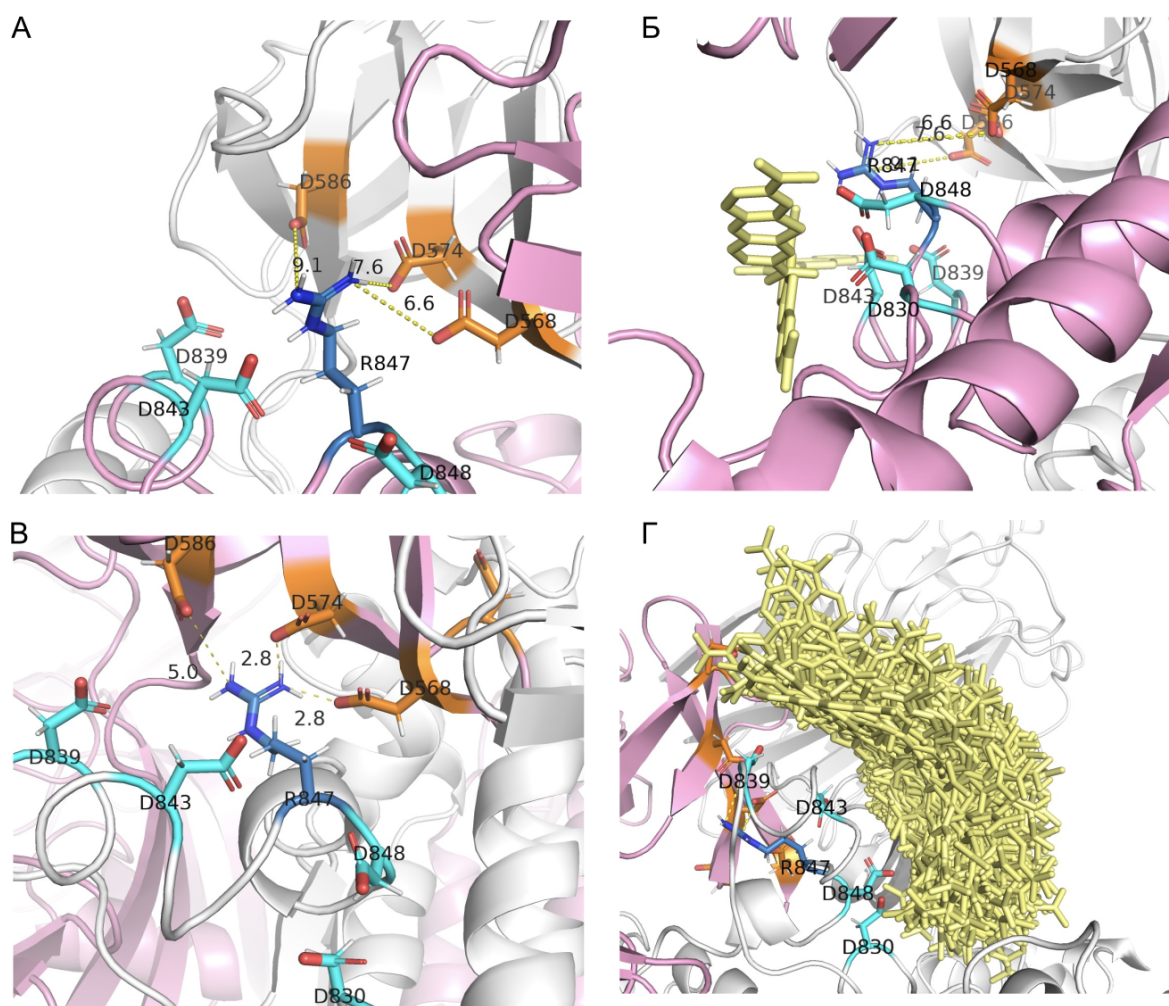


Рисунок 3.3.8 – Arg847 (показан синим) протомера S-белка SARS-CoV-2 в «открытом» (А-Б) и «закрытом» (В-Г) состояниях и его аминокислотное окружение. Остатки аспартата, принадлежащие тому же протимеру S-белка, что и Arg847, окрашены в голубой цвет, а остатки аспартата, принадлежащие соседнему протимеру S-белка, окрашены в оранжевый цвет. Протимер S-белка в «открытом» состоянии показан розовым цветом, а соседний протимер в «закрытом» состоянии – белым. На панелях (Б,Г) показаны возможные положения молекул метиленового синего относительно S-белка. Молекулы метиленового синего показаны желтым цветом. Пунктирными желтыми линиями отмечены расстояния между некоторыми контактирующими аминокислотными остатками

В отличие от ZnPc^{8+} метиленовый синий способен проникать внутрь кармана, образующегося в результате перехода RBD в «открытое» состояние (рисунок 3.3.6 Б). Эта область S-белка, связывающая метиленовый синий, обладает сложной, подобной лабиринту, геометрией, образованной аминокислотными остатками NTD, RBD и HR1 доменов, принадлежащих протимерам в «открытом» и «закрытом» состояниях. Связывание метиленового синего с этой полостью может влиять на взаимодействие S-

белков с ACE2 рецепторами клетки-хозяина и таким образом ослаблять инфективность вирусов, объясняя темновую активность данного антимикробного соединения.

Таким образом, нами с применением метода БД было обнаружено 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 на поверхности S-белков SARS-CoV-2 и MERS-CoV, что позволяет предположить возможное влияние данных ФС на процесс расщепления S1 и S2 субъединиц. Связывание ZnPc^{8+} и метиленового синего с аминокислотами SARS-CoV-2 и MERS-CoV, граничащими с FP, позволяет предположить, что катионные фотосенсибилизаторы также могут влиять на процесс слияния вирусной мембраны с мембраной клетки-хозяина. В отличие от двух других коронавирусов для SARS-CoV показано наличие заметной отрицательно заряженной области, расположенной в NTD. Продemonстрированное связывание катионных ФС с NTD может препятствовать взаимодействию S-белка SARS-CoV с клеточными рецепторами.

Помимо обнаруженных различий в связывании ZnPc^{8+} и метиленового синего с S-белками коронавирусов найдена основная общая для них область связывания данных ФС, расположенная на границе «головы» и «ноги» спайкового белка на расстоянии около 10 нм от поверхности липидного бислоя. Электростатическое взаимодействие ФС с данной областью достаточно для эффективного окислительного повреждения при поглощении света определенной длины волны как гликопротеинов, так и липидной оболочки вирионов.”

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 инаktivации 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 сольюбилизацию бислоя. Антисептик октенидин обладает дезинтегрирующими свойствами в отношении характерной для полюсов бактериальной клетки мембраны состава фосфатидилэтаноламин:фосфатидилглицерол:кардиолипин 81:7:12 (по массе).
3. Процесс проникновения фотосенсибилизатора октакис(холинил)фталоцианин 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);

Публикации Холиной Екатерины Георгиевны по теме диссертации в журналах, входящих в список ВАК, 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

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

Список сокращений

- аФДТ – антимикробная фотодинамическая терапия
- АФК – активные формы кислорода
- БД – броуновская динамика
- ГК – гистидиновая протеинкиназа
- Кдо – 3-дезоксид-D-манно-окт-2-улозоновая кислота
- КЗ – крупнозернистый
- ЛПС – липополисахарид
- ЛПС // DPPE – асимметричная мембрана, в одном монослое которой присутствуют липополисахариды, во втором – молекулы дипальмитоил-фосфатидилэтаноламина
- МД – молекулярная динамика
- Мкс – микросекунда
- НАО – 10-N-нонил акридиновый оранжевый
- Нс – наносекунда
- $^1\text{O}_2$ – синглетный кислород
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- РБ – регуляторный белок
- СПА – общий полисахаридный антиген
- ФС – фотосенсибилизатор
- ФЭАТ – фосфоэтаноламинтрансфераза
- ЧАС – четвертичные аммониевые соединения
- Arg – аргинин
- Asp – аспартат
- CDL2 – кардиолипид с зарядом -2
- CHL – хлоргексидин
- CP – C-терминальный домен
- DPPE – дипальмитоил-фосфатидилэтаноламин
- FP – белок слияния
- Нер – L-глицеро-D-манно-гептоза

HR1 – гептадный повтор 1

HR2 – гептадный повтор 2

MERS-CoV – коронавирус ближневосточного респираторного синдрома

MIR – мирамистин

mPRL – модифицированный шероховатый липополисахарид *P. aeruginosa*
без остатка фосфоэтаноламина в составе коровой части

NTD – N-концевой терминальный домен

OCT – октенидин

PIC – пиклоксидин

POPC – пальмитоил-олеоил фосфатидилхолин

POPE – пальмитоил-олеоил фосфатидилэтанолламин

POPE:POPG – симметричная мембрана указанного состава

POPG – пальмитоил-олеоил фосфатидилглицерол

PRL – шероховатый липополисахарид *P. aeruginosa*

RBD – рецептор связывающий домен

S-белок – белок шипа коронавируса

SARS-CoV – вирус тяжелого острого респираторного синдрома

SARS-CoV-2 – вирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 типа

ZnPc – металлофталочинин цинка

ZnPc⁸⁺ – октакис(холинил)фталочинин цинка

Список литературы

1. *Коваленко И. Б.* Изучение механизмов взаимодействия фотосинтетических электрон-транспортных белков методом прямого многочастичного моделирования: дис. ... д-ра физ.-мат. наук: 03.01.02 / И. Б. Коваленко – Москва, 2016. – 208 с.
2. *Халатян А. С.* Чувствительность антибиотикорезистентных коагулазонегативных стафилококков к антисептику пиклоксидину / А. С. Халатян, М. В. Будзинская, Е. Г. Холина, М. Г. Страховская, Н. А. Колышкина, И. Б. Коваленко, В. Г. Жуховицкий // Клиническая практика – 2020. – Т. 11 – № 1 – С. 42–48.
3. *Халатян А. С.* Бактерицидное действие пиклоксидина на штаммы *Staphylococcus epidermidis*, выделенные с конъюнктивы на фоне интравитреальных инъекций / А. С. Халатян, М. В. Будзинская, Е. Г. Холина, М. Г. Страховская, Н. В. Шевлягина, В. Г. Жуховицкий // Современные технологии в офтальмологии – 2019. – № 1 – С. 315–320.
4. *Халатян А. С.* Антибактериальное действие антисептика пиклоксидина дигидрохлорида на конъюнктивальные изоляты грамотрицательных бактерий / А. С. Халатян, Е. Г. Холина, М. Г. Страховская, М. В. Будзинская, Н. В. Шевлягина, В. Г. Жуховицкий // Вестник офтальмологии – 2021. – Т. 137 – № 5 – С. 238–247.
5. *Холина Е. Г.* Экспериментальное и теоретическое исследование эффективности связывания замещенных поликатионных металлофталочианинов с липополисахаридами: диплом. работа / Е. Г. Холина – Москва, 2015. – 70 с.
6. *Холина Е. Г.* Взаимодействие катионных антисептиков с кардиолипинсодержащей модельной бактериальной мембраной / Е. Г. Холина, М. Е. Боздаганян, М. Г. Страховская, И. Б. Коваленко // Медицина экстремальных ситуаций – 2021. – № 3 – С. 38–45.
7. *Хрущёв С. С.* Моделирование белок-белковых взаимодействий с применением программного комплекса многочастичной броуновской динамики ProKSim / С. С. Хрущёв, А. М. Абатурова, А. Н. Дьяконова, Д. М. Устинин, Д. В. Зленко, В. А. Федоров, И. Б. Коваленко, Г. Ю. Ризниченко, А. Б. Рубин // Компьютерные исследования и моделирование – 2013. – Т. 5 – № 1 – С. 47–64.
8. *Abraham M. J.* Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers / M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Pall, J. C. Smith, B. Hess, E. Lindah // SoftwareX – 2015. – V. 1 – P. 19–25.
9. *Agostinis P.* Photodynamic therapy of cancer: an update / P. Agostinis, K. Berg, K.

- Cengel, T. Foster, A. Girotti, S. Gollnick, S. Hahn, M. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. Wilson, J. Golab // *CA. Cancer J. Clin.* – 2011. – V. 61 – № 4 – P. 250–281.
10. *Ahn V. E.* A hydrocarbon ruler measures palmitate in the enzymatic acylation of endotoxin / V. E. Ahn, E. I. Lo, C. K. Engel, L. Chen, P. M. Hwang, L. E. Kay, R. E. Bishop, G. G. Prive // *EMBO J.* – 2004. – V. 23 – № 15 – P. 2931–2941.
 11. *Almeida A.* Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Control of COVID-19 / A. Almeida, M. A. Faustino, M. G. Neves // *Antibiotics* – 2020. – V. 9 – № 6 – P. 320.
 12. *Almeida A.* Photodynamic inactivation of bacteria: Finding the effective targets / A. Almeida, M. A. Faustino, J. P. Tome // *Future Med. Chem.* – 2015. – V. 7. – № 10. – P. 1221–1224.
 13. *Alves E.* An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation / E. Alves, M. A. Faustino, M. G. Neves, A. Cunha, J. Tome, A. Almeida // *Future Med. Chem.* – 2014. – V. 6 – № 2 – P. 141–164.
 14. *Amos S. B.* Antimicrobial Peptide Potency is Facilitated by Greater Conformational Flexibility when Binding to Gram-negative Bacterial Inner Membranes / S. B. Amos, L. S. Vermeer, P. M. Ferguson, J. Kozłowska, M. Davy, T. T. Bui, A. J. Mason // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6 – № 1 – P. 1–13.
 15. *Amsterdam D.* Disinfectants and antiseptics: Modes of action, mechanisms of resistance, and testing regimens / D. Amsterdam, B. Ostrov // In D. Amsterdam (Ed.), *Antibiot. Lab. Med.* – Wolters Kluwer Health Adis (ESP), 2014. – P. 1135–1230.
 16. *Anandan A.* Structure of a lipid A phosphoethanolamine transferase suggests how conformational changes govern substrate binding / A. Anandan, G. L. Evans, K. Condić-Jurkic, M. L. O'Mara, C. M. John, N. J. Phillips, G. A. Jarvis, S. S. Wills, K. A. Stubbs, I. Moraes, C. M. Kahler, A. Vrielink // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2017. – V. 114 – № 9 – P. 2218–2223.
 17. *Anandan A.* Structure and function of lipid A-modifying enzymes // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2020. – T. 1459. – № 1. – 19–37c.
 18. *Antonelli A.* In vitro antimicrobial activity of the decontaminant hybenx® compared to chlorhexidine and sodium hypochlorite against common bacterial and yeast pathogens / A. Antonelli, L. Giovannini, I. Baccani, V. Giuliani, R. Pace, G. M. Rossolini // *Antibiotics* – 2019. – V. 8 – № 4 – P. 188.
 19. *Bacellar I. O.* Mechanisms of Photosensitized Lipid Oxidation and Membrane Permeabilization / I. O. Bacellar, M. S. Baptista // *ACS Omega* – 2019. – V. 4 – № 26 – P. 21636–21646.

20. *Barrett-Bee K.* The membrane destabilising action of the antibacterial agent chlorhexidine / K. Barrett-Bee, L. Newbould, S. Edwards // FEMS Microbiol. Lett. – 1994. – V. 119 – № 1–2 – P. 249–253.
21. *Belouzard S.* Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein / S. Belouzard, J. Millet, B. Licitra, G. Whittaker // Viruses – 2012. – V. 4 – № 6 – P. 1011–1033.
22. *Bennett W.* The importance of membrane defects-lessons from simulations / W. Bennett, D. Tieleman // Acc. Chem. Res. – 2014. – V. 47 – № 8 – P. 2244–2251.
23. *Berglund N.* Interaction of the antimicrobial peptide polymyxin B1 with both membranes of E. coli: a molecular dynamics study / N. Berglund, T. Piggot, D. Jefferies, R. Sessions, P. Bond, S. Khalid // PLoS Comput. Biol. – 2015. – V. 11 – № 4 – P. e1004180.
24. *Blasco P.* Conformational Dynamics of the Lipopolysaccharide from Escherichia coli O91 Revealed by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Molecular Simulations / P. Blasco, D. S. Patel, O. Engstrom, W. Im, G. Widmalm // Biochemistry – 2017. – V. 56 – № 29 – P. 3826–3839.
25. *Bojadzic D.* Methylene Blue Inhibits the SARS-CoV-2 Spike–ACE2 Protein-Protein Interaction—a Mechanism that can Contribute to its Antiviral Activity Against COVID-19 / D. Bojadzic, O. Alcazar, P. Buchwald // Front. Pharmacol. – 2021. – P. 2255.
26. *Bruininks B. M.* A Practical View of the Martini Force Field / B. M. Bruininks, P. C. Souza, S. J. Marrink // In M. Bonomi, C. Camilloni (Eds.), Biomol. Simulations: Methods Mol. Biol. – Humana, NY: Springer, 2019. – P. 105–127.
27. *Bryant C. E.* The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide / C. E. Bryant, D. R. Spring, M. Gangloff, N. J. Gay // Nat. Rev. Microbiol. – 2010. – V. 8 – № 1 – P. 8–14.
28. *Cai Y.* Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein / Y. Cai, J. Zhang, T. Xiao, H. Peng, S. Sterling, R. Walsh, S. Rawson, S. Rits-Volloch, B. Chen // Science. – 2020. – V. 369 – № 6511 – P. 1586–1592.
29. *Caroff M.* Structure of bacterial lipopolysaccharides / M. Caroff, D. Karibian // Carbohydr. Res. – 2003. – V. 338 – № 23 – P. 2431–2447.
30. *Caroff M.* Lipopolysaccharides: Structure, function and bacterial identification / M. Caroff, A. Novikov // OCL – EDP Sciences, 2020. – V. 27 – P. 31.
31. *Casalino L.* Beyond Shielding: The Roles of Glycans in the SARS-CoV-2 Spike Protein / L. Casalino, Z. Gaieb, J. A. Goldsmith, C. K. Hjorth, A. C. Dommer, A. M. Harbison, C. A. Fogarty, E. P. Barros, B. C. Taylor, J. S. McLellan, E. Fadda, R. E. Amaro // ACS Cent. Sci. – 2020. – V. 6 – № 10 – P. 1722–1734.

32. *Casciola M.* A molecular dynamic study of cholesterol rich lipid membranes: Comparison of electroporation protocols / M. Casciola, D. Bonhenry, M. Liberti, F. Apollonio, M. Tarek // *Bioelectrochemistry* – 2014. – V. 100 – P. 11–17.
33. *Casciola M.* A molecular insight into the electro-transfer of small molecules through electropores driven by electric fields / M. Casciola, M. Tarek // *Biochim. Biophys Acta* – 2016. – V. 1858 – № 10 – P. 2278–2289.
34. *Cheung H. Y.* Differential Actions of Chlorhexidine on the Cell Wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* / H. Y. Cheung, M. M. Wong, S. H. Cheung, L. Y. Liang, Y. W. Lam, S. K. Chiu // *PLoS One* – 2012. – V. 7 – № 5 – P. e36659.
35. *Cieplik F.* Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't / F. Cieplik, D. Deng, W. Crielaard, W. Buchalla, E. Hellwig, A. Al-Ahmad, T. Maisch // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2018. – V. 44 – № 5 – P. 571–589.
36. *Clausen T.* SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2 / T. Clausen, D. Sandoval, C. Spliid, J. Pihl, H. Perrett, C. Painter, A. Narayanan, S. Majowicz, E. Kwong, R. McVicar, B. Thacker, C. Glass, Z. Yang, J. Torres, G. Golden, P. Bartels, R. Porell, A. Garretson, L. Laubach, J. Feldman, X. Yin, Y. Pu, B. Hauser, T. Caradonna, B. Kellman, C. Martino, P. Gordts, S. Chanda, A. Schmidt, K. Godula, S. Leibel, J. Jose, K. Corbett, A. Ward, A. Carlin, J. Esko // *Cell* – 2020. – V. 183 – № 4 – P. 1043- 1057.e15.
37. *Davies M. J.* Protein oxidation and peroxidation / M. J. Davies // *Biochem. J* – 2016. – V. 473 – P. 805–825.
38. *De Jong D. H.* Martini straight: Boosting performance using a shorter cutoff and GPUs / D. H. DeJong, S. Baoukina, H. I. Ingolfsson, S. J. Marrink // *Comput. Phys. Commun.* – 2016. – V. 199 – P. 1–7.
39. *Dias R. P.* Outer Membrane Remodeling : The Structural Dynamics and Electrostatics of Rough Lipopolysaccharide Chemotypes / R. P. Dias, G. C. Da Hora, M. Ramstedt, T. A. Soares // *J. Chem. Theory Comput.* – 2014. – V. 10 – № 6 – P. 2488–2497.
40. *Dixon D. R.* Lipopolysaccharide heterogeneity: Innate host responses to bacterial modification of lipid A structure / D. R. Dixon, R. P. Darveau // *J. Dent. Res.* – 2005. – V. 84 – № 7 – P. 584–595.
41. *Dolgushin F. M.* Interplay of noncovalent interactions in antiseptic quaternary ammonium surfactant Miramistin / F. M. Dolgushin, A. S. Goloveshkin, I. V. Ananyev, S. V. Osintseva, Y. V. Torubaev, S. S. Krylov, A. S. Golub // *Acta Crystallogr. Sect. C* – 2019. – V. 75 – № 4 – P. 402–411.
42. *Drozdetskiy A.* JPred4: a protein secondary structure prediction server / A. Drozdetskiy, C.

- Cole, J. Procter, BartonGJ // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43 – № W1 – P. W389–W394.
43. *Epand R. M.* Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents / R. M. Epand, R. F. Epand // *Biochim. Biophys. Acta* – 2009. – V. 1788 – № 1 – P. 289–294.
 44. *Epand R. M.* Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents / R. M. Epand, R. F. Epand // *J. Pept. Sci.* – 2011. – V. 17 – № 5 – P. 298–305.
 45. *Erridge C.* Structure and function of lipopolysaccharides / C. Erridge, E. Bennett-Guerrero, I. R. Poxton // *Microbes Infect.* – 2002. – V. 4 – № 8 – P. 837–851.
 46. *Evanics F.* Topology of an outer-membrane enzyme: Measuring oxygen and water contacts in solution NMR studies of PagP / F. Evanics, P. M. Hwang, Y. Cheng, L. E. Kay, R. S. Prosser // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – V. 128 – № 25 – P. 8256–8264.
 47. *Falzone L.* Current and innovative methods for the diagnosis of COVID-19 infection / L. Falzone, G. Gattuso, A. Tsatsakis, D. A. Spandidos, M. Libra, L. Falzone, G. Gattuso, A. Tsatsakis, D. A. Spandidos, M. Libra, L. Falzone, G. Gattuso, A. Tsatsakis, D. A. Spandidos, M. Libra // *Int. J. Mol. Med.* – 2021. – V. 47 – № 6 – P. 1–23.
 48. *Fedorov V.* What Binds Cationic Photosensitizers Better: Brownian Dynamics Reveals Key Interaction Sites on Spike Proteins of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 / V. Fedorov, E. Kholina, S. Khrushev, I. Kovalenko, A. Rubin, M. Strakhovskaya // *Viruses* – 2021. – V. 13 – № 8 – P. 1615.
 49. *Fernandez M.* Effects of dimethyl sulfoxide on lipid membrane electroporation / M. Fernandez, R. Reigada // *J. Phys. Chem. B* – 2014. – V. 118 – № 31 – P. 9306–9312.
 50. *Fernandez M. L.* Structural and kinetic molecular dynamics study of electroporation in cholesterol-containing bilayers / M. L. Fernandez, G. Marshall, F. Sagues, R. Reigada // *J. Phys. Chem. B* – 2010. – V. 114 – № 20 – P. 6855–6865.
 51. *Foote C.* Definition of type I and type II photosensitized oxidation / C. Foote // *Photochem. Photobiol.* – 1991. – V. 54 – № 5 – P. 659–659.
 52. *Galochkina T.* Conformational Dynamics of the Single Lipopolysaccharide O-Antigen in Solution / T. Galochkina, D. Zlenko, A. Nesterenko, I. Kovalenko, M. Strakhovskaya, A. Averyanov, A. Rubin // *ChemPhysChem* – 2016. – V. 17 – № 18 – P. 2839–2853.
 53. *Gao Y.* Preferred conformations of lipooligosaccharides and oligosaccharides of *Moraxella catarrhalis* / Y. Gao, J. Lee, G. Widmalm, W. Im // *Glycobiology* – 2020. – V. 30 – № 2 – P. 86–94.
 54. *Ghorbani J.* Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: An overview / J.

- Ghorbani, D. Rahban, S. Aghamiri, A. Teymouri, A. Bahador // *Laser Ther.* – 2018. – V. 27 – № 4 – P. 293–302.
55. *Gibbons H. S.* An inner membrane dioxygenase that generates the 2-hydroxymyristate moiety of Salmonella lipid A / H. S. Gibbons, C. M. Reynolds, Z. Guan, C. R. Raetz // *Biochemistry* – 2008. – V. 47 – № 9 – P. 2814–2825.
 56. *Gilbert P.* Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet / P. Gilbert, L. E. Moore // *J. Appl. Microbiol.* – 2005. – V. 99 – № 4 – P. 703–715.
 57. Granovsky A.A. Firefly (Formerly PC GAMESS) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://classic.chem.msu.su>.
 58. *Gurtovenko A. A.* Pore formation coupled to ion transport through lipid membranes as induced by transmembrane ionic charge imbalance: Atomistic molecular dynamics study / A. A. Gurtovenko, I. Vattulainen // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – V. 127 – № 50 – P. 17570–17571.
 59. *Hamblin M. R.* Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes / M. R. Hamblin // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2016. – V. 33 – P. 67–73.
 60. *Hamblin M. R.* Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? / M. R. Hamblin, T. Hasan // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2004. – V. 3 – № 5 – P. 436–450.
 61. *Hawkins C. L.* Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications / C. L. Hawkins, M. J. Davies // *J. Biol. Chem.* – 2019. – V. 294 – № 51 – P. 19683–19708.
 62. *Helander I. M.* Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin-resistant pmrA mutants of Salmonella typhimurium: a ³¹P-NMR study / I. M. Helander, I. Kilpeläinen, M. Vaara // *Mol. Microbiol.* – 1994. – V. 11 – № 3 – P. 481–487.
 63. *Hsu P. C.* CHARMM-GUI Martini Maker for modeling and simulation of complex bacterial membranes with lipopolysaccharides / P. C. Hsu, B. M. Bruininks, D. Jefferies, P. Cesar Telles de Souza, J. Lee, D. S. Patel, W. Im // *J. Comput. Chem.* – 2017. – V. 38 – № 27 – P. 2354–2363.
 64. *Hsu P. C.* Molecular Dynamics Simulations Predict the Pathways via Which Pristine Fullerenes Penetrate Bacterial Membranes / P. C. Hsu, D. Jefferies, S. Khalid // *J. Phys. Chem. B* – 2016. – V. 120 – № 43 – P. 11170–11179.
 65. *Huang H. W.* Molecular mechanism of antimicrobial peptides: The origin of cooperativity / H. W. Huang // *Biochim. Biophys. Acta* – 2006. – V. 1758 – № 9 – P. 1292–1302.
 66. *Hub J. S.* g_wham—A Free Weighted Histogram Analysis Implementation Including

- Robust Error and Autocorrelation Estimates / J. S. Hub, B. L. De Groot, D. Van Der Spoel // *J. Chem. Theory Comput.* – 2010. – V. 6 – № 12 – P. 3713–3720.
67. *Hubner N. O.* Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds / N. O. Hubner, J. Siebert, A. Kramer // *Skin Pharmacol. Physiol.* – 2010. – V. 23 – № 5 – P. 244–258.
 68. *Hug S.* Classical Molecular Dynamics in a Nutshell // In L. Monticelli, E. Salonen (Eds.), *Biomol. Simulations. Methods Mol. Biol: Methods and Protocols.* – Humana, NY: Springer, 2013. – P. 127–152.
 69. *Hughes A. V* Physical Properties of Bacterial Outer Membrane Models: Neutron Reflectometry & Molecular Simulation / A. V Hughes, D. S. Patel, G. Ran Widmalm, J. B. Klauda, L. A. Clifton, W. Im // *Biophys. J.* – 2019. – V. 116 – № 6 – P. 1095–1104.
 70. *Im W.* Molecular Simulations of Gram-Negative Bacterial Membranes Come of Age / W. Im, S. Khalid // *Annu. Rev. Phys. Chem.* – 2020. – V. 71 – P. 171–188.
 71. *Ivanova P. T.* Lipid composition of viral envelope of three strains of influenza virus – not all viruses are created equal / P. T. Ivanova, D. S. Myers, S. B. Milne, J. L. McClaren, P. G. Thomas, H. A. Brown // *ACS Infect. Dis.* – 2015. – V. 1 – № 9 – P. 435–442.
 72. *Jefferies D.* Atomistic and coarse-grained simulations of membrane proteins: A practical guide / D. Jefferies, S. Khalid // *Methods* – 2021. – V. 185 – P. 15–27.
 73. *Jefferies D.* Role of O-Antigen in Response to Mechanical Stress of the E. coli Outer Membrane: Insights from Coarse-Grained MD Simulations / D. Jefferies, J. Shearer, S. Khalid // *J. Phys. Chem. B* – 2019. – V. 123 – № 17 – P. 3567–3575.
 74. *Jo S.* CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM / S. Jo, T. Kim, V. G. Iyer, W. Im // *J. Comput. Chem.* – 2008. – V. 29 – № 11 – P. 1859–1865.
 75. *Jockusch S.* Photo-induced inactivation of viruses: adsorption of methylene blue, thionine, and thiopyronine on Qbeta bacteriophage. / S. Jockusch, D. Lee, N. J. Turro, E. F. Leonard // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1996. – V. 93 – № 15 – P. 7446.
 76. *Jones I. A.* Biocide Use in the Antimicrobial Era: A Review / I. A. Jones, L. T. Joshi // *Molecules* – 2021. – V. 26 – № 8 – P. 2276.
 77. *Joo H. S.* Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides / H. S. Joo, C. I. Fu, M. Otto // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* – 2016. – V. 371 – № 1695 – P. 20150292.
 78. *Jordan E. O.* The interconvertibility of “rough” and “smooth” bacterial types / E. O. Jordan // *J. Am. Med. Assoc.* – 1926. – V. 86 – № 3 – P. 177–178.
 79. *Kampf G.* Octenidine Dihydrochloride / G. Kampf // *Antiseptic Steward.* – 2018. – P. 535–561.

80. *Kashef N.* Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? / N. Kashef, M. R. Hamblin // *Drug Resist. Updat.* – 2017. – V. 31 – P. 31–42.
81. *Kastner J.* Umbrella sampling / J. Kastner // *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* – 2011. – V. 1 – № 6 – P. 932–942.
82. *Kathuria D.* “What’s in a structure?” The story of biguanides / D. Kathuria, A. A. Bankar, P. V. Bharatam // *J. Mol. Struct.* – 2018. – V. 1152 – P. 61–78.
83. *Khan M. A.* Molecular Mechanism for Lateral Lipid Diffusion between the Outer Membrane External Leaflet and a β -Barrel Hydrocarbon Ruler / M. A. Khan, R. E. Bishop // *Biochemistry* – 2009. – V. 48 – № 41 – P. 9745–9756.
84. *Kholina E. G.* Cationic Antiseptics Facilitate Pore Formation in Model Bacterial Membranes / E. G. Kholina, I. B. Kovalenko, M. E. Bozdaganyan, M. G. Strakhovskaya, P. S. Orekhov // *J. Phys. Chem. B* – 2020. – V. 124 – № 39 – P. 8593–8600.
85. *Kim S.* Bilayer Properties of Lipid A from Various Gram-Negative Bacteria / S. Kim, D. S. Patel, S. Park, J. Slusky, J. B. Klauda, G. Widmalm, W. Im // *Biophys. J.* – 2016. – V. 111 – № 8 – P. 1750–1760.
86. *Kim S. J.* Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14 / S. J. Kim, H. M. Kim // *BMB Rep.* – 2017. – V. 50 – № 2 – P. 55–57.
87. *King J. D.* Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* / J. D. King, D. Kocincova, E. L. Westman, J. S. Lam // *Innate Immun.* – 2009. – V. 15 – № 5 – P. 261–312.
88. *Kirsch S.* Membrane pore formation in atomistic and coarse-grained simulations / S. Kirsch, R. Bockmann // *Biochim. Biophys Acta* – 2016. – V. 1858 – № 10 – P. 2266–2277.
89. *Kirsch S. A.* Coupling of Membrane Nanodomain Formation and Enhanced Electroporation near Phase Transition / S. A. Kirsch, R. A. Bockmann // *Biophys. J.* – 2019. – V. 116 – № 11 – P. 2131–2148.
90. *Kirschner K. N.* A Glycam-Based Force Field for Simulations of Lipopolysaccharide Membranes: Parametrization and Validation / K. N. Kirschner, R. D. Lins, A. Maass, T. A. Soares // *J. Chem. Theory Comput.* – 2012. – V. 8 – № 11 – P. 4719–4731.
91. *Klausen M.* Design of Photosensitizing Agents for Targeted Antimicrobial Photodynamic Therapy / M. Klausen, M. Ucuncu, M. Bradley // *Molecules* – 2020. – V. 25 – № 22 – P. 5239.
92. *Knirel Y. A.* Conserved and variable structural features in the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* / Y. A. Knirel, O. V. Bystrova, N. A. Kocharova, U. Zahringer,

- G. B. Pier // *J. Endotoxin Res.* – 2006. – V. 12 – № 6 – P. 324–336.
93. *Korneev D.* Ultrastructural Aspects of Photodynamic Inactivation of Highly Pathogenic Avian H5N8 Influenza Virus / D. Korneev, O. Kurskaya, K. Sharshov, J. Eastwood, M. Strakhovskaya // *Viruses* – 2019. – V. 11 – № 10 – P. 955.
 94. *Kotnik T.* Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models / T. Kotnik, L. Rems, M. Tarek, D. Miklavcic // *Annu. Rev. Biophys.* – 2019. – V. 48 – P. 63–91.
 95. *Kropinski A. M.* Effect of growth temperature on the lipids, outer membrane proteins, and lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* PAO / A. M. Kropinski, V. Lewis, D. Berry // *J. Bacteriol.* – 1987. – V. 169 – № 5 – P. 1960–1966.
 96. *Kucerka N.* Effect of cations on the structure of bilayers formed by lipopolysaccharides isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / N. Kucerka, E. Papp-Szabo, M. P. Nieh, T. A. Harroun, S. R. Schooling, J. Pencer, E. A. Nicholson, T. J. Beveridge, J. Katsaras // *J. Phys. Chem. B* – 2008. – V. 112 – № 27 – P. 8057–8062.
 97. *Kumar S.* The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules / S. Kumar, D. Bouzida, R. H. Swendsen, P. A. Kollman, J. M. Rosenberg // *J. Comput. Chem.* – 1992. – V. 13 – № 8 – P. 1011–1021.
 98. *Kuznetsova N.* Photodynamic inactivation of avian influenza virus in aqueous media // *Proc. First Int. Work. Appl. Redox Technol. Environ. Istanbul, Turkey, 2009.* – P. 145–147.
 99. *Kwiatkowski S.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations / S. Kwiatkowski, B. Knap, D. Przystupski, J. Saczko, E. Kedzierska, K. Knap-Czop, J. Kotlinska, O. Michel, K. Kotowski, J. Kulbacka // *Biomed. Pharmacother.* – 2018. – V. 106. – P. 1098–1107.
 100. *Kyrou I.* Not only ACE2—the quest for additional host cell mediators of SARS-CoV-2 infection: Neuropilin-1 (NRP1) as a novel SARS-CoV-2 host cell entry mediator implicated in COVID-19 / I. Kyrou, H. S. Randeva, D. A. Spandidos, E. Karteris // *Signal Transduct. Target. Ther.* – 2021. – V. 6 – № 1 – P. 1–3.
 101. *Lam J. S.* Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide / J. S. Lam, V. L. Taylor, S. T. Islam, Y. Hao, D. Kocincova // *Front. Microbiol.* – Frontiers Research Foundation, 2011. – V. 2 – P. 118.
 102. *Lam M. Y.* Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* / M. Y. Lam, E. J. McGroarty, A. M. Kropinski, L. A. MacDonald, S. S. Pedersen, N. Hoiby, J. S. Lam // *J. Clin. Microbiol.* – 1989. – V. 27 – № 5 – P. 962–967.

103. *Langevin P.* On the theory of Brownian motion / P. Langevin // *Compt. Rendus* – 1908. – V. 146 – P. 530–533.
104. *Langham A.* Molecular simulations of antimicrobial peptides. / A. Langham, Y. N. Kaznessis // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – V. 618 – P. 267–285.
105. *Leach A. R.* Molecular Modelling. Principles and Applications / A. R. Leach – Harlow: Pearson education, 2001. – 744 p.
106. *Lee J.* CHARMM-GUI Membrane Builder for Complex Biological Membrane Simulations with Glycolipids and Lipoglycans / J. Lee, D. S. Patel, J. Stahle, S. J. Park, N. R. Kern, S. Kim, W. Im // *J. Chem. Theory Comput.* – 2019. – V. 15 – № 1 – P. 775–786.
107. *Lerouge I.* O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant–microbe interactions / I. Lerouge, J. Vanderleyden // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2002. – V. 26 – № 1 – P. 17–47.
108. *Li A.* Molecular dynamics modeling of *Pseudomonas aeruginosa* outer membranes / A. Li, J. W. Schertzer, X. Yong // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2018. – V. 20 – № 36 – P. 23635–23648.
109. *Lin T. Y.* Organization and function of anionic phospholipids in bacteria / T. Y. Lin, D. B. Weibel // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – V. 100 – № 10 – P. 4255–4267.
110. *Lins R. D.* Computer Simulation of the Rough Lipopolysaccharide Membrane of *Pseudomonas aeruginosa* / R. D. Lins, T. P. Straatsma // *Biophys. J.* – 2001. – V. 81 – № 2 – P. 1037–1046.
111. *Lu G.* Bat-to-human: spike features determining “host jump” of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond / G. Lu, Q. Wang, G. F. Gao // *Trends Microbiol.* – 2015. – V. 23 – № 8 – P. 468.
112. *Lu R.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding / R. Lu, X. Zhao, J. Li, P. Niu, B. Yang, H. Wu, W. Wang, H. Song, B. Huang, N. Zhu, Y. Bi, X. Ma, F. Zhan, L. Wang, T. Hu, H. Zhou, Z. Hu, W. Zhou, L. Zhao, J. Chen, Y. Meng, J. Wang, Y. Lin, J. Yuan, Z. Xie, J. Ma, W. J. Liu, D. Wang, W. Xu, E. C. Holmes, G. F. Gao, G. Wu, W. Chen, W. Shi, W. Tan // *Lancet* – 2020. – V. 395 – № 10224 – P. 565–574.
113. *Lu Y. C.* LPS/TLR4 signal transduction pathway / Y. C. Lu, W. C. Yeh, P. S. Ohashi // *Cytokine* – 2008. – V. 42 – № 2 – P. 145–151.
114. *Luderitz O.* Structural principles of lipopolysaccharides and biological properties of synthetic partial structures // In L. Anderson, F. Unger (Eds.), *Bact. Lipopolysaccharides: Struct. Synth. Biol. Act.* – Washington D. C.: Am. Chem. Soc. Symp. Series, 1983. – P. 3–17.

115. *Luna E.* Influences of *Vibrio cholerae* Lipid A Types on LPS Bilayer Properties / E. Luna, S. Kim, Y. Gao, G. Widmalm, W. Im // *J. Phys. Chem. B* – 2021. – V. 125 – № 8 – P. 2105–2112.
116. *Ma H.* Modeling Diversity in Structures of Bacterial Outer Membrane Lipids / H. Ma, D. D. Cummins, N. B. Edelstein, J. Gomez, A. Khan, M. D. Llewellyn, T. Picudella, S. R. Willsey, S. Nangia // *J. Chem. Theory Comput.* – 2017. – V. 13 – № 2 – P. 811–824.
117. *Ma H.* Simulating Gram-Negative Bacterial Outer Membrane: A Coarse Grain Model / H. Ma, F. J. Irudayanathan, W. Jiang, S. Nangia // *J. Phys. Chem. B* – 2015. – V. 119 – № 46 – P. 14668–14682.
118. *Madigan M. T.* Brock Biology of Microorganisms / M. T. Madigan, K. S. Bender, D. H. Buckley, W. M. Sattley, D. A. Stahl – Harlow: Pearson Education, 2019. – 1058 p.
119. *Majhi A. K.* Estimation of activation energy for electroporation and pore growth rate in liquid crystalline and gel phases of lipid bilayers using molecular dynamics simulations / A. K. Majhi, S. Kanchi, V. Venkataraman, K. G. Ayappa, P. K. Maiti // *Soft Matter* – 2015. – V. 11 – № 44 – P. 8632–8640.
120. *Makarov D. A.* Effects of the degree of substitution on the physicochemical properties and photodynamic activity of zinc and aluminum phthalocyanine polycations / D. A. Makarov, N. A. Kuznetsova, O. A. Yuzhakova, L. P. Savvina, O. L. Kaliya, E. A. Lukyanets, V. M. Negrimovskii, M. G. Strakhovskaya // *Russ. J. Phys. Chem. A* – 2009. – V. 83 – № 6 – P. 1044–1050.
121. *Makarov D. A.* Cationic Zn and Al phthalocyanines: synthesis, spectroscopy and photosensitizing properties / D. A. Makarov, O. A. Yuzhakova, L. K. Slivka, N. A. Kuznetsova, V. M. Negrimovsky, O. L. Kaliya, E. A. Lukyanets // *J. Porphyrines Phtalocyanines* – 2007. – V. 11 – № 08 – P. 586–595.
122. *Makin S. A.* *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ceases to express serotype-specific lipopolysaccharide at 45°C / S. A. Makin, T. J. Beveridge // *J. Bacteriol.* – 1996. – V. 178 – № 11 – P. 3350–3352.
123. *Malanovic N.* Octenidine: Novel insights into the detailed killing mechanism of Gram-negative bacteria at a cellular and molecular level / N. Malanovic, A. On, G. Pabst, A. Zellner, K. Lohner // *Int. J. Antimicrob. Agents* – 2020. – V. 56 – № 5 – P. 106146.
124. *Malde A. K.* An Automated force field Topology Builder (ATB) and repository: Version 1.0 / A. K. Malde, L. Zuo, M. Breeze, M. Stroet, D. Poger, P. C. Nair, C. Oostenbrink, A. E. Mark // *J. Chem. Theory Comput.* – 2011. – V. 7 – № 12 – P. 4026–4037.
125. *Malvern Instruments Ltd.* Size theory / Malvern Instruments Ltd. // *Zetasizer Nano User Man.* – 2013. – T. MAN0485 – № 11 – P. 250.

126. *Marrink S. J.* The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations / S. J. Marrink, H. J. Risselada, S. Yefimov, P. D. Tieleman, A. H. De Vries // *J. Phys. Chem. B* – 2007. – V. 111 – № 27 – P. 7812–7824.
127. *Matsumoto K.* Lipid domains in bacterial membranes / K. Matsumoto, J. Kusaka, A. Nishibori, H. Hara // *Mol. Microbiol.* – 2006. – V. 61 – № 5 – P. 1110–1117.
128. *McDonnell G.* Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance / G. McDonnell, A. D. Russell // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1999. – V. 12 – № 1 – P. 147.
129. *Memish Z.* Middle East respiratory syndrome / Z. Memish, S. Perlman, M. Van Kerkhove, A. Zumla // *Lancet* – 2020. – V. 395 – № 10229 – P. 1063–1077.
130. *Mileykovskaya E.* Visualization of phospholipid domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange / E. Mileykovskaya, W. Dowhan // *J. Bacteriol.* – 2000. – V. 182 – № 4 – P. 1172–1175.
131. *Mileykovskaya E.* Role of membrane lipids in bacterial division-site selection / E. Mileykovskaya, W. Dowhan // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2005. – V. 8 – № 2 – P. 135–142.
132. *Mileykovskaya E.* Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes / E. Mileykovskaya, W. Dowhan // *Biochim. Biophys. Acta* – 2009. – V. 1788 – № 10 – P. 2084–2091.
133. *Moan J.* The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen / J. Moan, K. Berg // *Photochem. Photobiol.* – 1991. – V. 53 – № 4 – P. 549–553.
134. *Monticelli L.* Force fields for classical molecular dynamics / L. Monticelli, D. Tieleman // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – V. 924 – P. 197–213.
135. *Moreira L. M.* Photodynamic therapy: Porphyrins and phthalocyanines as photosensitizers / L. M. Moreira, F. V. Dos Santos, J. P. Lyon, M. Maftoum-Costa, C. Pacheco-Soares, N. Soares Da Silva // *Aust. J. Chem.* – 2008. – V. 61 – № 10 – P. 741–754.
136. *Mozes N.* Immobilization of microorganisms by adhesion: interplay of electrostatic and nonelectrostatic interactions / N. Mozes, F. Marchal, M. Hermesse, J. Van Haecht, L. Reuliaux, A. Leonard, P. Rouxhet // *Biotechnol. Bioeng.* – 1987. – V. 30 – № 3 – P. 439–450.
137. *Mukherjee S.* Accelerated molecular dynamics simulation analysis of MSI-594 in a lipid bilayer / S. Mukherjee, R. K. Kar, R. P. Nanga, K. H. Mroue, A. Ramamoorthy, A. Bhunia // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2017. – V. 19 – № 29 – P. 19289–19299.
138. *Neuman B. W.* A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology / B. W. Neuman, G. Kiss, A. H. Kunding, D. Bhella, M. F. Baksh, S. Connelly, B. Droese, J. P. Klaus, S. Makino, S. G. Sawicki, S. G. Siddell, D. G. Stamou, I.

- A. Wilson, P. Kuhn, M. J. Buchmeier // *J. Struct. Biol.* – 2011. – V. 174 – № 1 – P. 11–22.
139. *Nikaido H.* Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria / H. Nikaido // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2001. – V. 12 – № 3 – P. 215–223.
 140. *Nikaido H.* Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability / H. Nikaido // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2003. – V. 67 – № 4 – P. 593–656.
 141. *Noman A.* Spike glycoproteins: Their significance for corona viruses and receptor binding activities for pathogenesis and viral survival / A. Noman, M. Aqeel, N. Khalid, M. Hashem, S. Alamari, S. Zafar, M. Qasim, M. K. Irshad, S. H. Qari // *Microb. Pathog.* – 2021. – V. 150 – P. 104719.
 142. *Nummila K.* Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of *Escherichia coli* are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A / K. Nummila, I. Kilpelainen, U. Zahringer, M. Vaara, I. M. Helander // *Mol. Microbiol.* – 1995. – V. 16 – № 2 – P. 271–278.
 143. *Oniszczyk A.* The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use / A. Oniszczyk, K. A. Wojtunik-Kulesza, T. Oniszczyk, K. Kasprzak // *Biomed. Pharmacother.* – 2016. – V. 83 – P. 912–929.
 144. *Orehov P. S.* Molecular Mechanism of Uptake of Cationic Photoantimicrobial Phthalocyanine across Bacterial Membranes Revealed by Molecular Dynamics Simulations / P. S. Orehov, E. G. Kholina, M. E. Bozdaganyan, A. M. Nesterenko, I. B. Kovalenko, M. G. Strakhovskaya // *J. Phys. Chem. B* – 2018. – V. 122 – № 14 – P. 3711–3722.
 145. *Osmanov A.* The antiseptic Miramistin: a review of its comparative in vitro and clinical activity / A. Osmanov, Z. Farooq, M. D. Richardson, D. W. Denning // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2020. – V. 44 – № 4 – P. 399–417.
 146. *Osmanov A.* In vitro and in vivo efficacy of miramistin against drug-resistant fungi / A. Osmanov, A. Wise, D. W. Denning // *J. Med. Microbiol.* – 2019. – V. 68 – № 7 – P. 1047–1052.
 147. *Park Y.* Structures of MERS-CoV spike glycoprotein in complex with sialoside attachment receptors / Y. Park, A. Walls, Z. Wang, M. Sauer, W. Li, M. Tortorici, B. Bosch, F. DiMaio, D. Veisler // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2019. – V. 26 – № 12 – P. 1151–1157.
 148. *Periole X.* The martini coarse-grained force field // In: L. Monticelli, E. Salonen (Eds.) *Biomol. Simulations. Methods Mol. Biol: Methods and Protocols* – Totowa N. J.: Humana

Press, 2013. – P. 533–565.

149. *Perrin F.* Mouvement Brownien d'un ellipsoïde (II). Rotation libre et dépolariation des fluorescences. Translation et diffusion de molécules ellipsoïdale / F. Perrin // *J.Phys.Radium* – 1936. – V. 7 – № 1 – P. 1–11.
150. *Petrou V.* Structures of aminoarabinose transferase ArnT suggest a molecular basis for lipid A glycosylation / V. Petrou, C. Herrera, K. Schultz, O. Clarke, J. Vendome, D. Tomasek, S. Banerjee, K. Rajashankar, M. Belcher Dufrisne, B. Kloss, E. Kloppmann, B. Rost, C. Klug, M. Trent, L. Shapiro, F. Mancina // *Science* – 2016. – V. 351 – № 6273 – P. 608–612.
151. *Piggot T. J.* Electroporation of the E. coli and S. aureus membranes: Molecular dynamics simulations of complex bacterial membranes / T. J. Piggot, D. A. Holdbrook, S. Khalid // *J. Phys. Chem. B* – 2011. – V. 115 – № 45 – P. 13381–13388.
152. *Polak A.* Electroporation of archaeal lipid membranes using MD simulations / A. Polak, M. Tarek, M. Tomsic, J. Valant, N. P. Ulrih, A. Jamnik, P. Kramar, D. Miklavcic // *Bioelectrochemistry* – 2014. – V. 100 – P. 18–26.
153. *Pons T.* Hydrodynamic dimensions, electrophoretic mobility, and stability of hydrophilic quantum dots / T. Pons, H. T. Uyeda, I. L. Medintz, H. Mattoussi // *J. Phys. Chem. B* – 2006. – V. 110 – № 41 – P. 20308–20316.
154. *Raetz C. R. H.* Biochemistry of endotoxins / C. R. H. Raetz // *Annu. Rev. Biochem.* – 1990. – V. 59 – № 1 – P. 129–170.
155. *Raetz C. R. H.* Lipid a modification systems in gram-negative bacteria/ C. R. H. Raetz, C. M. Reynolds, M. S. Trent, R. E. Bishop // *Annu. Rev. Biochem.* – 2007. – V. 76. – P. 295–329.
156. *Raetz C. R. H.* Lipopolysaccharide endotoxins / C. R. H. Raetz, C. Whitfield // *Annu. Rev. Biochem.* – 2002. – T. 71. – P. 635–700.
157. *Reynolds C. M.* An outer membrane enzyme encoded by Salmonella typhimurium lpxR that removes the 3'-acyloxyacyl moiety of lipid A / C. M. Reynolds, A. A. Ribeiro, S. C. McGrath, R. J. Cotter, C. R. H. Raetz, M. S. Trent // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281 – № 31 – P. 21974–21987.
158. *Rice A.* Lipopolysaccharide Simulations Are Sensitive to Phosphate Charge and Ion Parameterization / A. Rice, M. T. Rooney, A. I. Greenwood, M. L. Cotten, J. Wereszczynski // *J. Chem. Theory Comput.* – 2020. – V. 16 – № 3 – P. 1806–1815.
159. *Rice A.* Atomistic Scale Effects of Lipopolysaccharide Modifications on Bacterial Outer Membrane Defenses / A. Rice, J. Wereszczynski // *Biophys. J.* – 2018. – V. 114 – № 6 – P. 1389–1399.

160. *Romantsov T.* Protein Localization in Escherichia coli Cells: Comparison of the Cytoplasmic Membrane Proteins ProP, LacY, ProW, AqpZ, MscS, and MscL / T. Romantsov, A. R. Battle, J. L. Hendel, B. Martinac, J. M. Wood // J. Bacteriol. – 2010. – V. 192 – № 4 – P. 912–924.
161. *Rutten L.* Crystal structure and catalytic mechanism of the LPS 3-O-deacylase PagL from Pseudomonas aeruginosa / L. Rutten, J. Geurtsen, W. Lambert, J. J. Smolenaers, A. M. Bonvin, A. De Haan, P. Van Der Ley, M. R. Egmond, P. Gros, J. Tommassen // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2006. – V. 103 – № 18 – P. 7071–7076.
162. *Rutten L.* Active-site architecture and catalytic mechanism of the lipid a deacylase LpxR of Salmonella typhimurium / L. Rutten, J. P. Mannie, C. M. Stead, C. R. H. Raetz, C. M. Reynolds, A. M. Bonvin, J. P. Tommassen, M. R. Egmond, M. S. Trent, P. Gros // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2009. – V. 106 – № 6 – P. 1960–1964.
163. *Sabra W.* Alterations in the formation of lipopolysaccharide and membrane vesicles on the surface of Pseudomonas aeruginosa PAO1 under oxygen stress conditions / W. Sabra, H. Lunsdorf, A. P. Zeng // Microbiology – 2003. – V. 149 – № 10 – P. 2789–2795.
164. *Sangari F. J.* Molecular basis of Brucella pathogenicity: an update / F. J. Sangari, J. Aguero // Microbiologia – 1996. – V. 12 – № 2 – P. 207–218.
165. *Schmid N.* Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7 / N. Schmid, A. P. Eichenberger, A. Choutko, S. Riniker, M. Winger, A. E. Mark, W. F. Van Gunsteren // Eur. Biophys. J. – 2011. – V. 40 – № 7 – P. 843–856.
166. *Seelig A.* Dynamic structure of fatty acyl chains in a phospholipid bilayer measured by deuterium magnetic resonance / A. Seelig, J. Seelig // Biochemistry – 1974. – V. 13 – № 23 – P. 4839–4845.
167. *Seelig J.* Deuterium magnetic resonance: Theory and application to lipid membranes / J. Seelig // Q. Rev. Biophys. – 1977. – V. 10 – № 3 – P. 353–418.
168. *Seyran M.* The structural basis of accelerated host cell entry by SARS-CoV-2 / M. Seyran, K. Takayama, V. Uversky, K. Lundstrom, G. Palu, S. Sherchan, D. Attrish, N. Rezaei, A. Aljabali, S. Ghosh, D. Pizzol, G. Chauhan, P. Adadi, T. Mohamed Abd El-Aziz, A. Soares, R. Kandimalla, M. Tambuwala, S. Hassan, G. Azad, P. Pal Choudhury, W. Baetas-da-Cruz, A. Serrano-Aroca, A. Brufsky, B. Uhal // FEBS J. – 2021. – V. 288 – № 17 – P. 5010–5020.
169. *Shalamanov D. S.* Chlorhexidine Gluconate-Induced Morphological Changes in Gram Negative Microorganisms / D. S. Shalamanov // Biotechnol. Biotechnol. Equip. – 2005. – V. 19 – № 1 – P. 121–124.
170. *Sharshov K.* The Photosensitizer Octakis (cholynyl) 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 / K. Sharshov, M. Solomatina, O. Kurskaya, I. Kovalenko, E. Kholina, V. Fedorov, G. Meerovich, A. Rubin, M. Strakhovskaya // *Viruses* – 2021. – V. 13 – № 4 – P. 643.
171. *Shearer J.* Outer Membrane Proteins OmpA, FhuA, OmpF, EstA, BtuB, and OmpX Have Unique Lipopolysaccharide Fingerprints / J. Shearer, D. Jefferies, S. Khalid // *J. Chem. Theory Comput.* – 2019. – V. 15 – № 4 – P. 2608–2619.
 172. *Silipo A.* Lipid A Structure // In Y.A. Knirel, M. A. Valvano (Eds.) *Bact. Lipopolysaccharides*. – Vienna: Springer, 2011. – P. 1–20.
 173. *Simpson B. W.* Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences / B. W. Simpson, M. S. Trent // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2019. – V. 17 – № 7 – P. 403.
 174. *Snyder S.* Lipopolysaccharide bilayer structure: effect of chemotype, core mutations, divalent cations, and temperature / S. Snyder, D. Kim, T. J. McIntosh // *Biochemistry – Biochemistry*, 1999. – V. 38 – № 33 – P. 10758–10767.
 175. *Soares T. A.* Assessment of the convergence of molecular dynamics simulations of lipopolysaccharide membranes Assessment of the convergence of molecular dynamics simulations of lipopolysaccharide membranes / T. A. Soares, T. P. Straatsma // *Mol. Simul.* – 2008a. – V. 34 – № 3 – P. 295–307.
 176. *Soares T. A.* Influence of the B-band O-antigen chain in the structure and electrostatics of the lipopolysaccharide membrane of *Pseudomonas aeruginosa* / T. A. Soares, T. P. Straatsma, R. D. Lins // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2008b. – V. 19 – № 2 – P. 312–320.
 177. *Strahl H.* Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function / H. Strahl, J. Errington // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2017. – V. 71 – P. 519–538.
 178. *Strakhovskaya M.* Electrostatic binding of substituted metal phthalocyanines to enterobacterial cells: its role in photodynamic inactivation / M. Strakhovskaya, Y. Antonenko, A. Pashkovskaya, E. Kotova, V. Kireev, V. Zhukhovitsky, N. Kuznetsova, O. Yuzhakova, V. Negrimovsky, A. Rubin // *Biochem.* – 2009. – V. 74 – № 12 – P. 1305–1314.
 179. *Strakhovskaya M. G.* The effect of some antiseptic drugs on the energy transfer in chromatophore photosynthetic membranes of purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides* / M. G. Strakhovskaya, E. P. Lukashev, B. N. Korvatovskiy, E. G. Kholina, N. K. Seifullina, P. P. Knox, V. Z. Paschenko // *Photosynth. Res.* 2021 1472 – 2021. – V. 147 – № 2 – P. 197–209.
 180. *Tarek M.* Membrane electroporation: A molecular dynamics simulation / M. Tarek // *Biophys. J.* – 2005. – V. 88 – № 6 – P. 4045–4053.

181. *Thomas S.* The Structure of the Membrane Protein of SARS-CoV-2 Resembles the Sugar Transporter SemiSWEET / S. Thomas // *Pathog. Immun.* – 2020. – V. 5 – № 1 – P. 342–363.
182. *Tian X.* LpxT-Dependent Phosphorylation of Lipid A in *Escherichia coli* Increases Resistance to Deoxycholate and Enhances Gut Colonization / X. Tian, G. Manat, E. Gasiorowski, R. Auger, S. Hicham, D. Mengin-Lecreulx, I. G. Boneca, T. Touze // *Front. Microbiol.* – 2021. – V. 12 – P. 1035.
183. *Tieleman D. P.* Simulation of pore formation in lipid bilayers by mechanical stress and electric fields / D. P. Tieleman, H. Leontiadou, A. E. Mark, S. J. Marrink // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – V. 125 – № 21 – P. 6382–6383.
184. *Tierney A. R.* Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance / A. R. Tierney, P. N. Rather // *Future Microbiol.* – 2019. – V. 14 – № 6 – P. 533–552.
185. *Torrie G. M.* Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling / G. M. Torrie, J. P. Valleau // *J. Comput. Phys.* – 1977. – V. 23 – № 2 – P. 187–199.
186. *Touze T.* Undecaprenyl Phosphate Synthesis / T. Touze, D. Mengin-Lecreulx // *EcoSal Plus* – 2008. – V. 3 – № 1 – P. 1–20.
187. *Trent M. S.* A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) that Catalyzes 3-O-Deacylation of Lipid A Precursors in Membranes of *Salmonella typhimurium* / M. S. Trent, W. Pabich, C. R. H. Raetz, S. I. Miller // *J. Biol. Chem.* – J Biol Chem, 2001a. – V. 276 – № 12 – P. 9083–9092.
188. *Trent M. S.* An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: Induction in polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor / M. S. Trent, A. A. Ribeiro, S. Lin, R. J. Cotter, C. R. H. Raetz // *J. Biol. Chem.* – J Biol Chem, 2001b. – V. 276 – № 46 – P. 43122–43131.
189. *Tsatsakis A.* SARS-CoV-2 pathophysiology and its clinical implications: An integrative overview of the pharmacotherapeutic management of COVID-19 / A. Tsatsakis, D. Calina, L. Falzone, D. Petrakis, R. Mitrut, V. Siokas, M. Pennisi, G. Lanza, M. Libra, S. G. Doukas, P. G. Doukas, L. Kavali, A. Bukhari, C. Gadiparthi, D. P. Vageli, D. P. Kofteridis, D. A. Spandidos, M. M. Paoliello, M. Aschner, A. O. Docea // *Food Chem. Toxicol.* – 2020. – V. 146 – P. 111769.
190. *Van Oosten B.* A MARTINI extension for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 lipopolysaccharide / B. Van Oosten, T. A. Harroun // *J. Mol. Graph. Model.* – 2016. – T. 63 – P. 125–133.
191. *Van Oosten B.* Testing High Concentrations of Membrane Active Antibiotic

- Chlorhexidine Via Computational Titration and Calorimetry / B. Van Oosten, D. Marquardt, T. A. Harroun // *J. Phys. Chem. B* – 2017. – V. 121 – № 18 – P. 4657–4668.
192. *Van Oosten B.* Small molecule interaction with lipid bilayers: A molecular dynamics study of chlorhexidine / B. VanOosten, D. Marquardt, I. Komljenovic, J. P. Bradshaw, E. Sternin, T. A. Harroun // *J. Mol. Graph. Model.* – 2014. – V. 48 – P. 96–104.
 193. *Vatansever F.* Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species – bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond / F. Vatansever, W. C. De Melo, P. Avci, D. Vecchio, M. Sadasivam, A. Gupta, R. Chandran, M. Karimi, N. A. Parizotto, R. Yin, G. P. Tegos, M. R. Hamblin // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2013. – V. 37 – № 6 – P. 955–989.
 194. *Vereshchagin A. N.* Molecular Sciences Quaternary Ammonium Compounds (QACs) and Ionic Liquids (ILs) as Biocides: From Simple Antiseptics to Tunable Antimicrobials / A. N. Vereshchagin, N. A. Frolov, K. S. Egorova, M. M. Seitkalieva, V. P. Ananikov // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22 – № 13 – P. 6793.
 195. *Vigant F.* A Mechanistic Paradigm for Broad-Spectrum Antivirals that Target Virus-Cell Fusion / F. Vigant, J. Lee, A. Hollmann, L. B. Tanner, Z. A. Ataman, T. Yun, G. Shui, H. C. Aguilar, D. Zhang, D. Meriwether, G. Roman-Sosa, L. R. Robinson, T. L. Juelich, H. Buczkowski, S. Chou, M. A. Castanho, M. C. Wolf, J. K. Smith, A. Banyard, M. Kielian, S. Reddy, M. R. Wenk, M. Selke, N. C. Santos, A. N. Freiberg, M. E. Jung, B. Lee // *PLOS Pathog.* – 2013. – V. 9 – № 4 – P. e1003297.
 196. *Walls A.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein / A. Walls, Y. Park, M. Tortorici, A. Wall, A. McGuire, D. Veelsler // *Cell* – 2020. – V. 181 – № 2 – P. 281- 292.e6.
 197. *Walls A. C.* Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer / A. C. Walls, M. A. Tortorici, B. J. Bosch, B. Frenz, P. J. M. Rottier, F. DiMaio, F. A. Rey, D. Veelsler // *Nature* – 2016. – V. 531 – № 7592 – P. 114–117.
 198. *Wang X.* Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification/ X. Wang, P. J. Quinn // *Prog. Lipid Res.* – 2010. – V. 49. – № 2. – P. 97–107.
 199. *Weaver J. C.* Electroporation: A general phenomenon for manipulating cells and tissues / J. C. Weaver // *J. Cell. Biochem.* – 1993. – V. 51 – № 4 – P. 426–435.
 200. *Webb B.* Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER / B. Webb, A. Sali // *Curr. Protoc. Bioinforma.* – 2016. – V. 54 – № 1 – P. 5.6.1-5.6.37.
 201. *Wilson W.* Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements / W. Wilson, M. Wade, S. Holman, F. Champlin // *J. Microbiol. Methods* – 2001. – V. 43 – № 3 – P. 153–164.

202. *Woo H.* Developing a Fully Glycosylated Full-Length SARS-CoV-2 Spike Protein Model in a Viral Membrane / H. Woo, S. J. Park, Y. K. Choi, T. Park, M. Tanveer, Y. Cao, N. R. Kern, J. Lee, M. S. Yeom, T. I. Croll, C. Seok, W. Im // *J. Phys. Chem. B* – 2020. – V. 124 – № 33 – P. 7128–7137.
203. World Health Organization SARS Outbreak Contained Worldwide [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.who.int/news/item/05-07-2003-sars-outbreak-contained-worldwide>.
204. World Health Organization Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers>.
205. World Health Organization Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
206. *Wu E. L.* Molecular dynamics and NMR spectroscopy studies of *E. coli* lipopolysaccharide structure and dynamics / E. L. Wu, O. Engstro, S. Jo, D. Stuhlsatz, M. S. Yeom, J. B. Klauda, G. R. Widmalm, W. Im // *Biophys. J.* – 2013. – V. 105 – № 6 – P. 1444–1455.
207. *Xie Y.* Spike Proteins of SARS-CoV and SARS-CoV-2 Utilize Different Mechanisms to Bind With Human ACE2 / Y. Xie, C. B. Karki, D. Du, H. Li, J. Wang, A. Sobitan, S. Teng, Q. Tang, L. Li // *Front. Mol. Biosci.* – 2020. – V. 7 – P. 392.
208. *Yesylevskyy S. O.* Polarizable Water Model for the Coarse-Grained MARTINI Force Field / S. O. Yesylevskyy, L. V. Schafer, D. Sengupta, S. J. Marrink // *PLoS Comput. Biol.* – 2010. – V. 6 – № 6 – P. e1000810.
209. *Zhang H.* Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target / H. Zhang, J. Penninger, Y. Li, N. Zhong, A. Slutsky // *Intensive Care Med.* – 2020. – T. 46 – № 4 – C.586–590.
210. *Zhang L.* Interactions of Bacterial Cationic Peptide Antibiotics with Outer and Cytoplasmic Membranes of *Pseudomonas aeruginosa* / L. Zhang, P. Dhillon, H. Yan, S. Farmer, R. E. Hancock // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2000. – V. 44 – № 12 – P. 3317.
211. *Zhang Y.* I-TASSER server for protein 3D structure prediction / Y. Zhang // *BMC Bioinforma.* 2008 91 – 2008a. – V. 9 – № 1 – P. 1–8.
212. *Zhang Y. M.* Membrane lipid homeostasis in bacteria / Y. M. Zhang, C. O. Rock // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008b. – V. 6 – № 3 – P. 222–233.
213. *Zheng L.* Molecular dynamics and simulation / L. Zheng, A. A. Alhossary, C. Kwoh, Y.

- Mu // In S. Ranganathan, M. Gribskov, K. Nakai, C. Schonbach (Eds.), *Encycl. Bioinformatics and Comput. Biol.* – Oxford: Academic Press, 2018. –P. 550–566.
- Bruininks B. M.* A Practical View of the Martini Force Field / B. M. Bruininks, P. C. Souza, S. J. Marrink // In M. Bonomi, C. Camilloni (Eds.), *Biomol. Simulations: Methods Mol. Biol.* – Humana, NY: Springer, 2019. – P. 105–127.
214. *Ziegler M. J.* Interface water dynamics and porating electric fields for phospholipid bilayers / M. J. Ziegler, P. Thomas Vernier // *J. Phys. Chem. B* – 2008. – V. 112 – № 43 – P. 13588–13596.