

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
доц. Олексій Юрійович Нипорко
Протокол №____ засідання кафедри
від “____” _____20__ р.

**IN SILICO ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕХАНІЗМІВ ВЗАЄМОДІЇ
ГАДОЛІНІЙ-ОРГАНІЧНИХ НАНОКОМПОЗИТІВ З ФОСФОЛПАЗОЮ С
БЕТА**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра

студента спеціальності

091 Біологія

ОП «Біологія (високі технології)»

Коваль Анастасії Олександрівни

Науковий керівник:

доцент кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

к.ф.-м.н. **Войтешенко Іван Сергійович**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

АНОТАЦІЯ

Коваль А.О. *In silico* дослідження молекулярних механізмів взаємодії гадоліній-органічних нанокompatитів з фосфоліпазою С бета. – Бакалаврська робота за спеціальністю 091 Біологія (високі технології).

У цьому дослідженні проведений молекулярний докінг, щоб дослідити взаємодію між функціоналізованими вуглецевими точками, що містять і не містять гадоліній, з фосфоліпазою С бета (PLC β). Процедура молекулярного докінгу проводили за допомогою програмного забезпечення Smina, яке застосовує усереднені параметри для важких металів як гадоліній.

Дослідження показало, що водневі зв'язки відіграють вирішальну роль у стабілізації взаємодій, тоді як взаємодії пі-катионів і пі-аніонів значно підвищують специфічність і спорідненість зв'язування, особливо в частинках, що містять гадоліній. Аналіз підкреслив часті взаємодії з такими амінокислотами, як аргінін (ARG) і глутамінова кислота (GLU), що свідчить про сильну афінність зв'язування із багатими на ці амінокислоти регіонами. Домени TIM і PH були найчастіше представлені серед сайтів зв'язування наночастинок після докінгу.

Ці результати підтверджуються дослідженнями *in vivo* та *in vitro*, які продемонстрували посилене скорочення гладких м'язів через активацію рецептора мускаринового ацетилхоліну, можливо, через алостеричну активацію PLC β цими нанокompatитами. Ці висновки створюють міцну основу для подальших досліджень, спрямованих на розробку контрастних речовин для МРТ на основі цих взаємодій.

Ключові слова: гадоліній, молекулярний докінг, наночастинки, фосфоліпаза С бета, МРТ контрастні речовини, афінність.

ЗМІСТ

| | |
|---|-----------|
| Вступ..... | 4 |
| РОЗДІЛ 1: ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ..... | 7 |
| 1.1 Молекулярний докінг: принципи, алгоритми та застосування у біомедичних дослідженнях..... | 7 |
| 1.2 Наночастинки в біомедицині..... | 8 |
| 1.2.1. Загальні знання та властивості наночастинок..... | 8 |
| 1.2.2. Застосування наночастинок в діагностиці та терапії..... | 10 |
| 1.2.3. Токсичність та біосумісність наночастинок..... | 10 |
| 1.2.4. Використання гадолінію в біомедицині..... | 11 |
| 1.2.5. Наночастинки для посилення контрастних агентів..... | 12 |
| 1.3. Структура, активація та функції фосфоліпази С бета..... | 12 |
| 1.3.1. Структура та функції фосфоліпази С бета..... | 12 |
| 1.3.2. Механізми активації фосфоліпази С бета..... | 14 |
| 1.3.3. Загальні функції фосфоліпази С бета..... | 14 |
| 2. Молекулярний докінг..... | 16 |
| 2.1. Процедура молекулярного докінгу..... | 16 |
| 2.2. Підготовка молекул ліганду..... | 16 |
| 2.3. Підготовка молекули рецептора..... | 18 |
| 2.4. Створення карт для молекулярного докінгу..... | 19 |
| 2.5. Сліпий і жорсткий докінг..... | 19 |
| 2.6. Ранжування результатів молекулярного докінгу..... | 21 |
| РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ..... | 22 |
| 3.1. Дослідження та результати молекулярних взаємодій між фосфоліпазою С бета та наночастинками з гадолінієм та без нього в комплексі з субодиницею G _{qa} | 22 |
| 3.1. Дослідження та результати молекулярних взаємодій між фосфоліпазою С бета та наночастинками з гадолінієм та без нього після виключення субодиниці G _{qa} | 32 |
| ВИСНОВКИ..... | 44 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ..... | 46 |

ВСТУП

Магнітно-резонансна томографія (МРТ) — це складний, неінвазивний метод діагностики, який використовує потужні магнітні поля в поєднанні з радіочастотними імпульсами для отримання детальних анатомічних зображень внутрішніх структур із високою роздільною здатністю. Ця техніка використовує принципи ядерного магнітного резонансу (ЯМР), коли ядра водню у тканинах тіла орієнтуються магнітним полем і згодом збуджується радіочастотними імпульсами. Релаксація цих ядер назад до рівноважного стану після збудження призводить до випромінювання радіочастотних сигналів, які виявляються та перетворюються на детальні зображення сканером МРТ [1].

МРТ є невід'ємною частиною візуалізації широкого спектру анатомічних областей, включаючи центральну нервову систему (головний і спинний мозок), кістково-м'язову систему (суглоби та кістки), м'які тканини та органи в грудній, черевній і тазовій порожнинах, а також судинної системи. Він особливо необхідний для діагностики та лікування нейродегенеративних розладів, новоутворень, серцево-судинних аномалій та травматичних ушкоджень [2].

У деяких клінічних сценаріях внутрішній контраст МРТ-зображень може бути неоптимальним, що потребує використання екзогенних контрастних агентів. Ці контрастні речовини вводяться внутрішньовенно або внутрішньоартеріально, сприяючи системному розподілу та переважному накопиченню в певних тканинах, тим самим збільшуючи їхню видимість на МРТ [3]. Контрастні агенти на основі гадолінію (GBCA) є золотим стандартом у посиленні контрастності МРТ завдяки парамагнітним властивостям іонів гадолінію (Gd^{3+}). Ці агенти значно зменшують час релаксації T_1 і T_2 навколишніх протонів води, тим самим помітно збільшуючи контраст зображення. Примітні приклади GBCA включають гадопентетат димеглюміну, гадодіамід, гадобутрол, гадотеридол і гадоксетат динатрію [4].

Незважаючи на їхню ефективність, використання GBCA пов'язане із занепокоєнням, включаючи ризик нефрогенного системного фіброзу (NSF) у пацієнтів із порушенням функції нирок і потенційну можливість тривалого утримання гадолінію в тканинах, що призводить до несприятливих ефектів [5]. Наночастинки, зокрема вуглецеві точки (CD), виявилися перспективними кандидатами для вирішення цих проблем завдяки їх високій розчинності у воді, низькій цитотоксичності та сильним люмінесцентним властивостям [6]. Вуглецеві точки можуть бути розроблені для спільної доставки іонів гадолінію, сприяючи їхньому ефективному виведенню із організму, забезпечуючи ефективне посилення контрасту гадолінію на МРТ, а також покращуючи їхню біосумісність та знижуючи токсичність [7].

Фосфоліпаза С бета (ФЛС- β) є основним ферментом, який бере участь у модуляції внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, які керують такими клітинними процесами, як проліферація, диференціювання та апоптоз [8]. З'ясування взаємодії між наночастинками та ФЛС- β може дати глибоке розуміння механізмів активації ферменту та його ролі в передачі сигналу. Дослідження молекулярного докінгу дозволяють моделювати ці взаємодії на атомарному рівні, що є вирішальним для раціонального дизайну нових діагностичних агентів.

Це дослідження зосереджено на молекулярному докінгу наночастинок, що не містять гадоліній, і наночастинок, що містять гадоліній, з ФЛС- β з метою оцінки якісних і кількісних аспектів цих взаємодій.

Основною метою цього дослідження було з'ясування молекулярних взаємодій між наночастинками, функціоналізованими гадолінієм, і фосфоліпазою С бета (ФЛС- β). Для отримання якісних результатів, робота проводилась наступним чином:

1. Знайти тривимірну структуру ФЛС- β , яка оптимально підходить під наші вимоги.

2. Квантово-механічні розрахунки були виконані для досягнення оптимальних структурних конформацій наночастинок як з гадолінієм, так і без нього.
3. Для з'ясування взаємодій зв'язування між наночастинками та ФЛС- β було проведено комплексний аналіз молекулярного докінгу.

РОЗДІЛ 1: ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Молекулярний докінг: принципи, алгоритми та застосування у біомедичних дослідженнях

Молекулярний докінг є ключовою комп'ютерною методологією у раціональному дизайні ліків, що дозволяє визначити найсприятливішу орієнтацію ліганду при його зв'язуванні з мішенню макромолекули, зазвичай білком і нуклеїною кислотою. Цей підхід на основі симуляції дозволяє характеризувати геометрію взаємодії та афінність зв'язування, надаючи важливу інформацію про молекулярні основи ефективності та специфічності ліганду. Основна мета молекулярного докінгу полягає в прогнозуванні оптимальної інтерфейсу взаємодій та просторового розташування ліганду в зв'язувальній кишені рецептора, що обумовлено принципами термодинаміки та молекулярної механіки [9]. Процес докінгу включає генерацію численних можливих поз зв'язування, після чого проводиться оцінка та ранжування цих поз за допомогою складних функцій оцінки, призначених для наближення вільної енергії зв'язування [10]. Методології молекулярного докінгу можуть бути класифіковані на основі ступеня гнучкості молекул та обсягу конформаційного відбору.

Традиційні методи жорсткого докінгу припускають статичну конформацію як для ліганду, так і для рецептора, спрощуючи обчислювальну складність, але потенційно нехтуючи важливими конформаційними змінами, необхідними для точного прогнозування зв'язування. З іншого боку, підходи гнучкого докінгу враховують динамічну природу біомолекул, дозволяючи конформаційні зміни як у ліганді, так і у рецепторі. Ця гнучкість підвищує біологічну значимість симуляцій докінгу, хоча й за рахунок збільшення обчислювальних вимог. Крім того, процес докінгу може бути зосереджений як на відомих активних ділянках, так і на вичерпному пошуку по всій поверхні молекули з метою виявлення нових зв'язувальних сайтів, що

особливо цінно в ситуаціях, коли активна ділянка невідома або при дослідженні алостеричних модуляторів [11]. Розроблено багато обчислювальних інструментів та алгоритмів для виконання молекулярного докінгу, кожен з яких включає унікальні алгоритмічні стратегії та функції оцінки для підвищення точності прогнозування взаємодії ліганд-рецептор. AutoDock, широко використовувана платформа, застосовує ламаркіанський генетичний алгоритм, який ітеративно оптимізує конформації ліганду для ефективного дослідження конформаційного простору та прогнозування зв'язувальних взаємодій [12]. Glide, розроблений компанією Schrödinger, використовує вичерпний алгоритм пошуку, поєднаний з власними функціями оцінки для досягнення високої точності у прогнозуванні зв'язувальних афінностей і поз [13]. MOE (Molecular Operating Environment) пропонує інтегровану сукупність інструментів для молекулярного моделювання, включаючи докінг, молекулярну динаміку та кількісні співвідношення структура-активність (QSAR), надаючи цілісний підхід до розробки ліків [14]. GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking) відомий своєю гнучкістю та надійними функціями оцінки, адаптованими до конкретних зв'язувальних середовищ, що дозволяє детально аналізувати взаємодії ліганду з білками [15]. Важливо зазначити, що Smina є одним з небагатьох в програмний інструмент, здатний ефективно розпізнавати та моделювати зв'язування з іонами гадолінію, що робить його незамінним у нашому дослідженні [16].

1.2 Наночастинки в біомедицині

1.2.1. Загальні знання та властивості наночастинок

Наночастинки, визначені як частинки з розмірами від 1 до 100 нанометрів, демонструють унікальні фізико-хімічні властивості, які виникають через їхні малі розміри та велике співвідношення поверхні до об'єму. Ці характеристики обумовлюють підвищену хімічну реакційну здатність, видатні оптичні та електронні властивості, а також значний

потенціал для функціоналізації поверхні, що робить наночастинки важливими в різних наукових і технологічних галузях, особливо в біомедицині [17].

Металеві наночастинки, такі як золото та срібло, володіють винятковими оптичними властивостями, що робить їх ідеальними кандидатами для діагностичних та терапевтичних застосувань, включаючи фототермічну терапію та візуалізацію. Наночастинки золота здатні перетворювати поглинене світло в тепло, яке може використовуватися для селективного пошкодження ракових клітин, завдяки чому вони широко досліджуються для онкотерапії [18]. Наночастинки срібла відомі своїми антимікробними властивостями і використовуються у складі пов'язок та покриттів для медичних пристроїв, з метою запобігання інфекціям [19].

Наночастинки на основі вуглецю, такі як вуглецеві точки (CDs), графен та вуглецеві нанотрубки, високо цінуються за їхню біосумісність, сильну люмінесценцію та можливість функціоналізації. Вуглецеві точки відрізняються високою водорозчинністю, низькою цитотоксичністю та відмінною фотостабільністю, що робить їх придатними для застосування у фармацевтиці. Графен та його похідні привернули значну увагу через їхню видатну механічну міцність, електропровідність та велику площу поверхні, що сприяє адсорбції та доставці лікарських засобів [20].

Полімерні наночастинки, виготовлені з біодеградабельних полімерів, таких як полі(молочна ко-гліколева кислота) (PLGA), полікапролактон (PCL) та хітозан, широко застосовуються у системах доставки лікарських засобів. Ці наночастинки можуть інкапсулювати терапевтичні агенти, захищати від деградації та звільняти їх контрольовано протягом тривалого періоду. Поверхня полімерних наночастинок може бути модифікована з використанням націлюваних лігандів для підвищення їхньої специфічності та ефективності при доставці ліків до певних тканин або клітин [21].

1.2.2. Застосування наночастинок в діагностиці та терапії

Застосування наночастинок у діагностиці та терапії суттєво змінює сучасну біомедицину, забезпечуючи можливості для цільової доставки та контрольованого вивільнення терапевтичних агентів. Ці частинки можуть бути розроблені таким чином, щоб покращити доставку контрастних агентів, підвищити роздільну здатність та точність методів візуалізації, а також підвищити біодоступність та ефективність лікарських засобів. Одним з найпоширеніших методів використання наночастинок у діагностиці є фотоакустична томографія. Ця техніка поєднує в собі високу оптичну специфічність і чутливість з високою роздільною здатністю та глибиною проникнення ультразвукових хвиль [22]. Наприклад, наночастинок на основі вуглецю використовуються як контрастні агенти, що дозволяють отримувати висококонтрастні зображення судин та інших біологічних структур. Для терапії наночастинок використовуються в фототермічній та фотодинамічній терапії [23]. У фототермічній терапії наночастинок, такі як золото або вуглецеві наночастинок, здатні перетворювати поглинене світло в тепло, підвищуючи температуру навколишніх тканин та спричиняючи загибель ракових клітин. У фотодинамічній терапії наночастинок доставляють фотосенсибілізатори до цільових клітин, які при опроміненні світлом генерують реактивні види кисню, що індукують загибель клітин.

1.2.3. Токсичність та біосумісність наночастинок

Токсичність та біосумісність наночастинок є критично важливими аспектами їхнього клінічного застосування, які потребують ретельного дослідження та оцінки. Параметри, такі як розмір, форма, заряд поверхні та хімічний склад наночастинок, значно впливають на їхню взаємодію з біологічними системами, визначаючи розподіл, клітинне поглинання та

потенційну токсичність. Наночастинки можуть викликати токсичні ефекти через різні механізми, включаючи генерацію реактивних форм кисню (ROS), запальні реакції, порушення функції клітинних мембран та індукцію апоптозу [24]. Наприклад, металеві наночастинки, такі як наночастинки срібла, можуть спричиняти утворення ROS, що призводить до оксидативного стресу та пошкодження клітин. У свою чергу, наночастинки золота можуть взаємодіяти з клітинними білками та ДНК, викликаючи структурні зміни та функціональні порушення [25]. Одним із важливих аспектів є здатність наночастинок утворювати біокорону – шар білків та інших біомолекул, які адсорбуються на поверхні при контакті з біологічними рідинами. Це явище може змінювати розпізнавання наночастинок імунною системою, а також їх біорозподіл та клітинне захоплення [26].

1.2.4. Використання гадолінію в біомедицині

Гадоліній (GD)-це рідкісний метал, який знайшов широке використання в медичній діагностиці завдяки його унікальним магнітним властивостям. Контрастні агенти на основі гадолінію (GBCA) використовуються в МРТ для посилення візуалізації внутрішніх органів та тканин. GBCA значно скорочують час релаксації T1 та T2, що призводить до посилення контрасту зображення та покращення візуалізації патологічних змін [27]. Однак використання GBCA пов'язане з помітними проблемами, включаючи ризик нефрогенного системного фіброзу (NSF) у пацієнтів з порушенням функції нирок та потенціал тривалого утримання тканини гадолінію, що може призвести до несприятливих ефектів. Наполегливість гадолінію в мозку та інших органах викликала проблеми безпеки, що потребує розвитку безпечніших контрастних агентів. Дослідження були зосереджені на розробці нових GBCA з поліпшеною біосумісністю та зниженою токсичністю, такими як макроциклічні хелати, які рідше вивільняють вільні іони гадолінію.

1.2.5. Наночастинки для посилення контрастних агентів

Наночастинки, зокрема вуглець, стали перспективними кандидатами для вирішення питань, пов'язаних з GBCA. Вуглецеві точки можуть бути розроблені для спільного відведення гадолінію, сприяючи їхньому ефективному виділенню із організму. Ця система спільної доставки гарантує, що гадоліній може ефективно посилити контраст для візуалізації та бути усуненим, тим самим зменшуючи ризики, пов'язані з його тривалим утриманням. Поліпшуючи біосумісність та знижуючи токсичність гадолінію, вуглець та інші наночастинки пропонують перспективне рішення для викликів, що виникають традиційними GBCA, потенційно перетворюючи профіль безпеки та ефективність контрастних агентів. Інноваційні підходи до використання наночастинок для посилення контрастних агентів можуть значно підвищити безпеку та ефективність діагностичних процедур. Наприклад, функціоналізація вуглецю з специфічними націлюючими лігандами може посилити їхнє накопичення у патологічних тканинах, забезпечуючи підвищення контрасту та діагностичну точність. Крім того, розвиток гібридних наночастинок, що поєднують властивості різних матеріалів, таких як золото та гадоліній, можуть запропонувати багатофункціональні платформи для одночасної візуалізації та терапії, ще більше просуваючи поле наномедицини.

1.3. Структура, активація та функції фосфоліпази С бета

1.3.1. Структура та функції фосфоліпази С бета

Фосфоліпаза С бета (ФЛС- β) є ключовим ензимом у шляхах передачі сигналів у клітинах, відповідальним за гідроліз фосфатидилінозитол 4,5-бісфосфату (ФІФ2) на два важливих вторинних месенджера: діацилгліцерол (ДАГ) та інозитол 1,4,5-трисфосфат (ІТФ) [28]. Ця реакція відіграє важливу роль у регулюванні багатьох клітинних процесів,

включаючи проліферацію, диференціацію, мотильність та метаболізм, шляхом моделювання внутрішньоклітинних рівнів кальцію та активації протеїнкінази С (РКС). ФЛС- β ізоферменти, такі як ФЛС- β 1, ФЛС- β 2, ФЛС- β 3 та ФЛС- β 4, демонструють різні механізми регуляції та тканинно-специфічні розподіли. Ензим складається з кількох консервативних доменів: плекстринового гомологічного домену (РН), мотивів EF-hand, каталізаторних доменів X та Y, а також домену C2. РН-домен важливий для прикріплення до мембрани, сприяючи взаємодії ензиму з ліпідним біошаром, де локалізується ФІФ2. Мотиви EF-hand зв'язують іони кальцію, які є критичними для активації ензиму. Каталізаторні домени X та Y утворюють ядро ензиму, відповідальне за його фосфоліпазну активність, тоді як домен C2 опосередковує взаємодії з іншими білками та ліпідами, сприяючи локалізації та функції ФЛС- β у клітині [29].

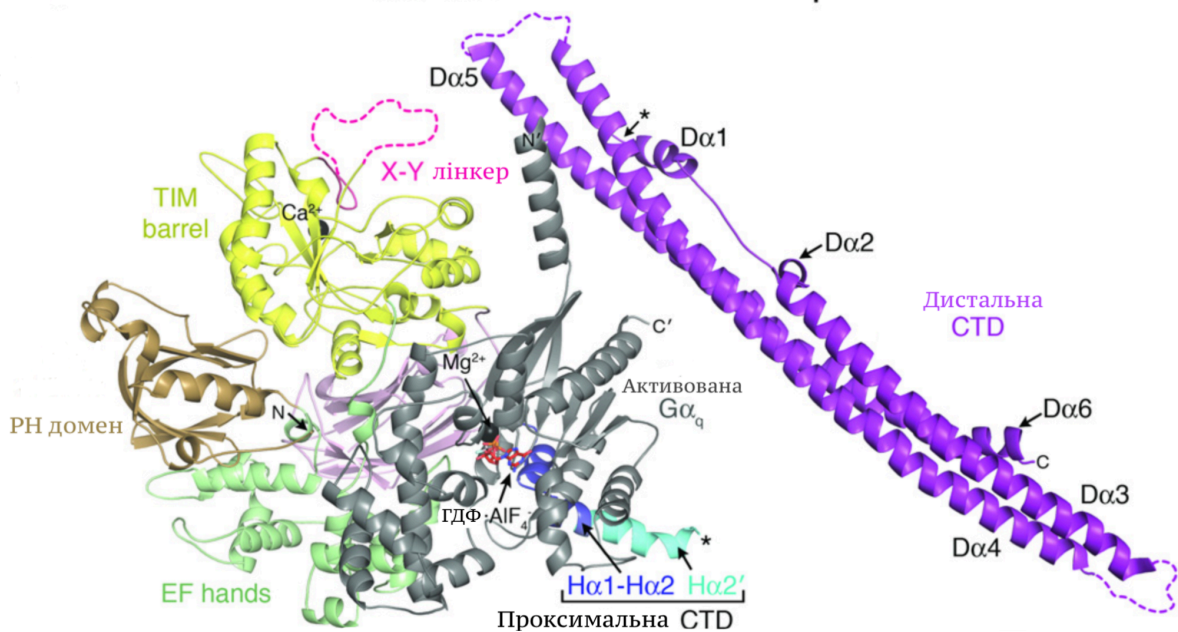


Рис. 1.1 - Структура повної довжини ФЛС- β 3 у комплексі з активованим $G\alpha_q$, отримана з PDB ID 4GNK. На зображенні домени ФЛС- β 3 позначені відповідними кольорами, а активований $G\alpha_q$ показаний сірим.

1.3.2. Механізми активації фосфоліпази С бета

Активація ФЛС- β в першу чергу регулюється рецепторами, зв'язаними з G-білками (GPCRs) [30]. При зв'язуванні ліганду з GPCR, асоційований G-білок (Gq/11) активує ФЛС- β через свою альфа-субодиницю (G α q). Ця активація індукує гідроліз ФІФ2 з утворенням ДАГ та ІТФ. ДАГ залишається в мембрані, активуючи РКС, тоді як ІТФ дифундує в цитоплазму, викликаючи вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних запасів та підсилюючи каскад передачі сигналів. Окрім GPCR-опосередкованої активації, активність ФЛС- β може бути модульована іншими сигнальними молекулами, такими як тирозинкінази та різні ліпіди [31]. Фосфорилування специфічними кіназами може підвищувати активність ФЛС- β , тоді як взаємодії з певними ліпідами можуть впливати на локалізацію та активність ензиму. Наприклад, фосфорилування ФЛС- β кіназами сімейства Src може збільшувати його каталітичну ефективність, таким чином підсилюючи подальші сигнальні шляхи.

1.3.3. Загальні функції фосфоліпази С бета

ФЛС- β виконує багато функцій у клітинній фізіології. Основна функція ФЛС- β полягає у регуляції внутрішньоклітинних рівнів кальцію через утворення IP3, який зв'язується з його рецепторами на ендоплазматичному ретикулумі, вивільняючи кальцій у цитоплазму [32]. Це підвищення концентрації кальцію є важливим для різних клітинних процесів, включаючи скорочення м'язів, секрецію, метаболізм та експресію генів. У процесі скорочення м'язів, особливо гладеньких та серцевих, ФЛС- β -утворений IP3 сприяє вивільненню кальцію з внутрішньоклітинних запасів, що сприяє процесу скорочення. Вивільнений кальцій зв'язується з кальмодуліном, який активує кіназу легких ланцюгів міозину (MLCK), приводячи до її фосфорилування і наступного скорочення м'язів [33]. Цей шлях підкреслює

важливу роль ФЛС- β у регуляції функції м'язів і підкреслює його значення у підтриманні серцево-судинного здоров'я.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2. Молекулярний докінг

2.1. Процедура молекулярного докінгу

Метою молекулярного докінгу є прогнозування взаємодії між сполукою та специфічним сайтом зв'язування на білку, а також оцінка афінності утвореного комплексу ліганд-білок. Ця взаємодія кількісно оцінюється за допомогою функції підрахунку скорів, яка визначає силу взаємодії шляхом аналізу ліганду з активними хімічними групами в межах сайту зв'язування [34]. Відповідно, ретельність оцінки взаємодії та точність ранжування результатів є вирішальними етапами віртуального скринінгу.

2.2. Підготовка молекул ліганду

Підготовка молекул ліганду є важливим етапом у процесі молекулярного докінгу, оскільки вона забезпечує, що хімічна структура ліганду підходить для взаємодії з цільовим білком. У цьому дослідженні ліганди, представлені вуглецевими точками (CD), були попередньо синтезовані та охарактеризовані. Ці наночастинки, зокрема типи CD_GE, CD_3011, CDF19 і CDN19, були описані в дослідженні [35].

Частинки для молекулярного докінгу були отримані з синтезу карбонових точок, збагаченими різними функціональними групами: CD_GE збагачені гідроксильованими вуглеводневими ланцюгами та метиленовими групами, CD_3011 містять карбоксильні та фенольні групи, що супроводжуються азотом, CDF19 мають трифторметильні групи, CDN19 містять групи толуїдину та аніліну.

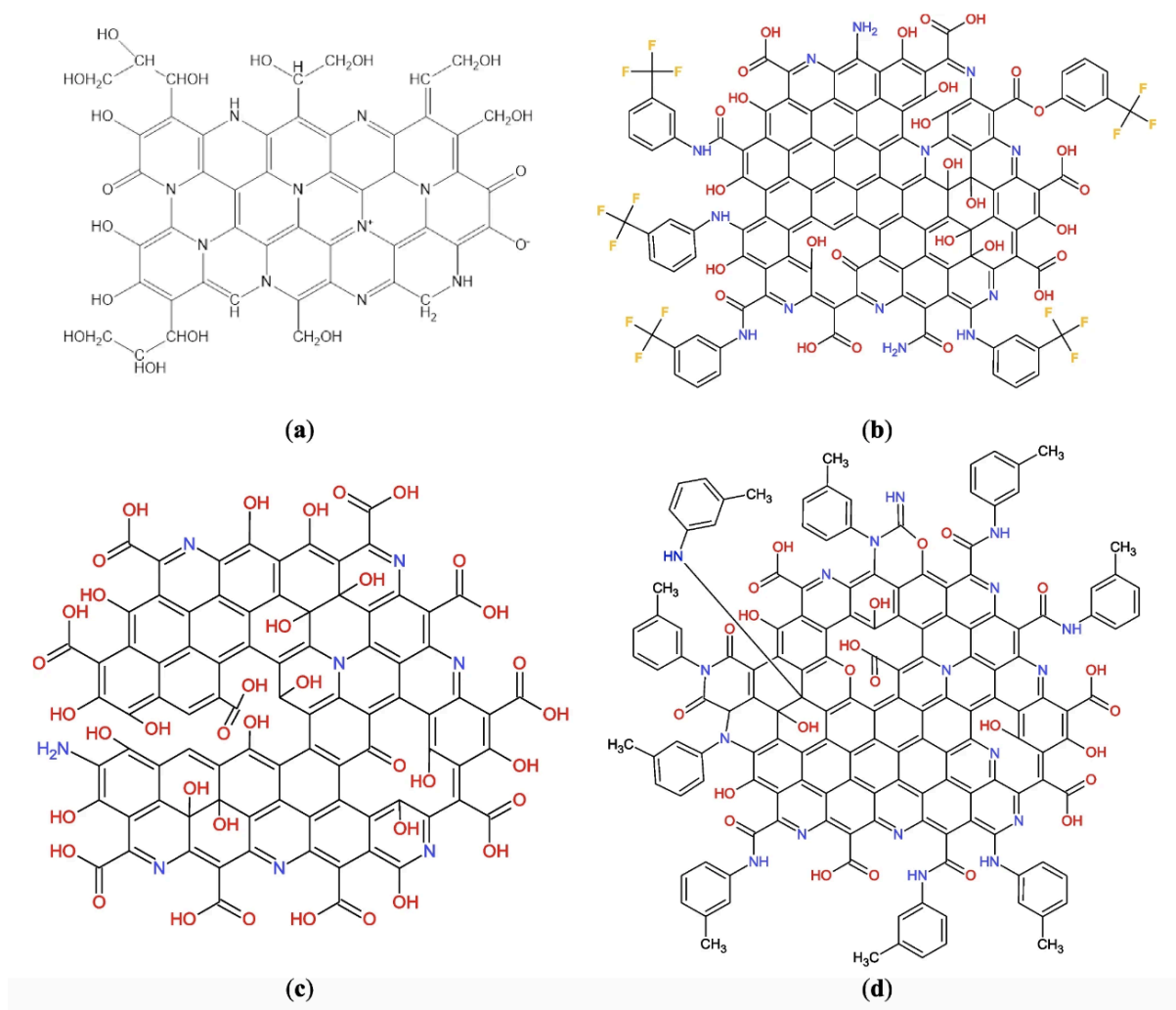


Рис. 2.1 - Запропоновані структури зразків CD_GE (a), CDF19 (b), CD_3011 (c) і CDN19 (d)

Використовуючи ці формули, ми побудували та оптимізували ліганди, включивши атоми гадолінію. Гадоліній був розміщений авторським способом з метою максимального охоплення всіх можливих варіантів внутрішньомолекулярних взаємодій: між наночастинками, у функціональних групах наночастинки, біля площини наночастинки, біля кисневих груп на площині наночастинки.

Перед докінгом ці наночастинки були піддані серії обчислювальних процедур, включаючи моделювання, оптимізацію квантово-механічними розрахунками, для точного представлення їхніх структурних властивостей. Квантово-механічні обчислення в даній роботі виконувались за допомогою

програмного забезпечення Gaussian G16 [36]. Оптимізована геометрія структур була обчислена з використанням двома підходами: методом Гартрі-Фока [37] з мінімальним базисом з поляризаційною функцією hf/3-21+g [38], обраного підходу достатньо для нашого дослідження оскільки ми намагались лише отримати конформаційні стани без енергетичних або електронно-топологічних характеристик. Структури з гадолінієм (Gd) оптимізувались також, без додаткового аналізу енергетичних або електронно-топологічних характеристик, методом hf/SDD opt=Loose SCF=XQC int=(grid=ultrafine), де SDD Штутгартські потенціали для $Z > 2$ [39], XQC – чисельна квадратично збіжна процедура [40] для SCF [41], opt=Loose пом'якшені критерії збіжності на покращеній сітці інтегрування відповідно int=(grid=ultrafine).

2.3. Підготовка молекули рецептора

Рецепторну молекулу, фосфоліпазу С бета (PDB ID: 4GNK), було отримано з Protein Data Bank (www.rcsb.org). Білок походить з організму Homo sapiens, а метод визначення структури – рентгенівська кристалографія з роздільною здатністю 2.0 Å. У складі білка також присутня альфа-субодиниця G α , яка є ключовим елементом у передачі сигналів через G-білок-зв'язані рецептори (GPCR). Ланцюг А представляє саме цю альфа-субодиницю G α , яка взаємодіє з фосфоліпазою С, активуючи її та сприяючи розщепленню фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфату. Процес підготовки включав видалення зайвих молекул кристалізованих лігандів, які могли заважати докуванню, з файлу PDB. Рішення використовувати людський варіант ФЛС- β замість щурячого варіанту ґрунтувалося на його прямій клінічній значущості. Основною метою цього дослідження є розробка контрастних речовин для застосування людиною. Використання варіанту людського ФЛС- β гарантує, що наші висновки безпосередньо можуть бути застосовані до людської медицини, тим самим підвищуючи трансляційний потенціал наших досліджень. Щоб підтвердити цей вибір, ми провели тест на гомологію

послідовності, який продемонстрував значний ступінь збереження ФЛС- β людини та щура з ідентичністю 91,9%.

2.4. Створення карт для молекулярного докінгу

Кarti докінгу визначають область рецептора, де будуть виконуватися розрахунки, і визначають типи атомів, які можуть бути присутніми в лігандах. Створення цих карт передбачає визначення зони докінгу за допомогою Грід-решітки, куба або паралелепіпеда, який охоплює місце докінгу. Для нашого дослідження параметри Грід-решітки були встановлені з центром у координатах $x = -40,4 \text{ \AA}$, $y = 15,3 \text{ \AA}$ і $z = -40,0 \text{ \AA}$, а також розміри $80 \times 80 \times 90 \text{ \AA}$ для першого варіанту докінгу, а також $x = -42,4 \text{ \AA}$, $y = 15,3 \text{ \AA}$ і $z = -40,0 \text{ \AA}$, а також розміри $100 \times 80 \times 90 \text{ \AA}$ для другої частини дослідження. Ці параметри гарантували, що були включені всі амінокислотні залишки, важливі для активності та селективності. Грід-решітку було створено з використанням Chimera [42]. Ми включили ланцюги А, В і Е у моделювання стикування. Ланцюг Е являє собою дистальний С-кінцевий домен (CTD), який бере участь у зв'язуванні мембрани. Це включення було необхідним, щоб дослідити можливі взаємодії між наночастинками та білком.

2.5. Сліпий і жорсткий докінг

У обчислювальних дослідженнях жорсткий і сліпий докінг зазвичай використовуються для дослідження потенційних взаємодій між молекулами та білками. Жорсткий докінг передбачає, що і ліганд, і рецептор є негнучкими структурами. Це припущення спрощує обчислювальну складність, дозволяючи ширше досліджувати орієнтації та конформації лігандів. За допомогою сліпого докування ми маємо змогу просканувати всю поверхню білка, сприяючи відкриттю нових сайтів зв'язування, які можуть бути пропущені через обмежені структурні чи біохімічні знання цільового білка.

Докінг проведено сліпим, жорстким докінгом за допомогою Smina, що є розширеною версією Vina AutoDock. Це програмне забезпечення дозволяє використовувати гадоліній шляхом застосування усереднених параметрів для невідомих металів.

Таблиця 2.2 Усереднені фізичні параметри для важких металів

| Параметр | Значення |
|-----------------|-----------------|
| Radius | 1,2 |
| Depth | 0 |
| Solvation | -0,0011 |
| Volume | 22,4493 |
| Covalent_radius | 1,75 |
| Xs_radius | 1,2 |
| Xs_hydrophobe | 0 |
| Xs_donor | 1 |
| Xs_accepтр | 0 |
| Ad_heteroatom | 1 |

Для цього ми використали Smina, гілку AutoDock Vina з покращеною функцією підрахунку балів. Smina використовує алгоритм пошуку Монте-Карло та функцію емпіричного підрахунку балів. Параметри, які використовувалися для докінгу, були за замовчуванням з такими значеннями: electrostatic(i=2, _=100, _c=8), ad4_solvation(d-sigma=3.6, _s/q=0.01097, _c=8), gauss(o=0, _w=0.5, _c=8), repulsion(o=0, _c=8), hydrophobic(g=0.5, _b=1.5, _c=8), non_hydrophobic (g=0.5, _b=1.5, _c=8), vdw(i=6, _j=12, _s=1, _=100, _c=8), non_dir_h_bond_lj(o=-0.7 _=100, _c=8), non_dir_anti_h_bond_quadratic(o=0, _c=8), non_dir_h_bond(g=-0.7, _b=0, _c=8), acceptor_acceptor_quadratic(o=0, _c=8), donor_donor_quadratic(o=0, _c=8), atom_type_gaussian(t1=t2, o=0, _w=0, _c=8), atom_type_linear(t1=t2, g=0, _b=0, _c=8), atom_type_quadratic(t1=t2, o=0, _c=8), atom_type_inverse_power(t1=t2, i=0, _=100, _c=8).

2.6. Ранжування результатів молекулярного докінгу

Результати молекулярного докінгу були ранжовані як за кількісними, так і за якісними параметрами. Кількісну оцінку проводили з використанням оціночної функції Smina, яка кількісно визначає силу взаємодії між лігандом і рецептором. Комбінована оцінка цих параметрів забезпечила комплексне ранжування потенційних взаємодій ліганд-рецептор, сприяння ідентифікації найбільш сприятливих взаємодій. У цьому дослідженні візуальний аналіз і якісна оцінка даних була проведена за допомогою програми Discovery Studio Visualizer 4.0 [43]. Процес включав візуалізацію взаємодій між лігандами та амінокислотними залишками сайтів зв'язування нашого рецептора.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження та результати молекулярних взаємодій між фосфоліпазою С бета та наночастинками з гадолінієм та без нього в комплексі з субодиноцею Gqa

Ми провели всебічне молекулярне докінг-дослідження для ретельної оцінки взаємодій зв'язування та афінностей різноманітних функціоналізованих наночастинок з фосфоліпазою С бета (ФЛС-β). Експериментальний дизайн було поділено на два окремі етапи, щоб отримати повне уявлення про взаємодію наночастинок з білком. На початковому етапі молекулярний докінг проводився в присутності субодиноці Gqa, щоб пояснити основний механізм дії та специфічні взаємодії зв'язування, які можуть потенційно сприяють активації або інгібації ФЛС-β. Цей підхід дозволив нам окреслити внутрішні характеристики зв'язування та профілі взаємодії наночастинок у межах визначеного білкового комплексу. На наступному етапі субодиноцю Gqa була виключена із взаємодії, щоб дослідити потенційну конкуренцію за зв'язування та можливість алостеричної модуляції наночастинками. Вилучення субодиноці Gqa дозволило нам виявити будь-які вторинні місця зв'язування та зрозуміти, як відсутність основного зв'язуючого партнера впливає на розподіл та афінність наночастинок по поверхні ФЛС-β. Така двоетапна стратегія дозволила провести детальний порівняльний аналіз, що надало уявлення про механістичні аспекти взаємодії наночастинок та їхні потенційні модулюючі ефекти на функцію ФЛС-β. Для першої частини нашої роботи площа поверхні фосфоліпази С бета у комплексі з субодиноцею Gqa була розрахована та становить 65358,0 Å².

Тож, у результаті першого етапу ми отримали наступні результати. Оптимізована наночастинка А без гадолінію показала високу афінність зв'язування з максимальним значенням -10,7 ккал/моль. Ці наночастинки переважно взаємодіють з ФЛС-β, утворюючи серію взаємодій біля структури

білка, але не у безпосередній близькості до субодиниці Gqa. Ця наночастинка взаємодіяла з кількома амінокислотами у В-ланцюзі ФЛС- β , включаючи GLU B:134, THR B:17, LYS B:137, MET B:140, LEU B:11, GLU B:14, ASP B:314, LEU B:315 і GLY B:694. Ці взаємодії склались із водневих зв'язків, вуглець-водневих зв'язків та пі-аніонних взаємодій. Зокрема, залишки GLU B:134, LYS B:137, MET B:140 взаємодіють із доменом PH, тоді як GLY B:694 взаємодіє з доменом TIM. Наявність множинних водневих зв'язків вказує на сильне та специфічне зв'язування, що сприяє стабільності наночастинок у цих областях. Площа поверхні наночастинки А без гадуліні була розрахована - 678.05 Å². Також було розраховано, що 77,20% площі поверхні наночастинки бере участь у взаємодії з білком. У взаємодію з наночастинкою бере участь 0,80% площі поверхні білка.

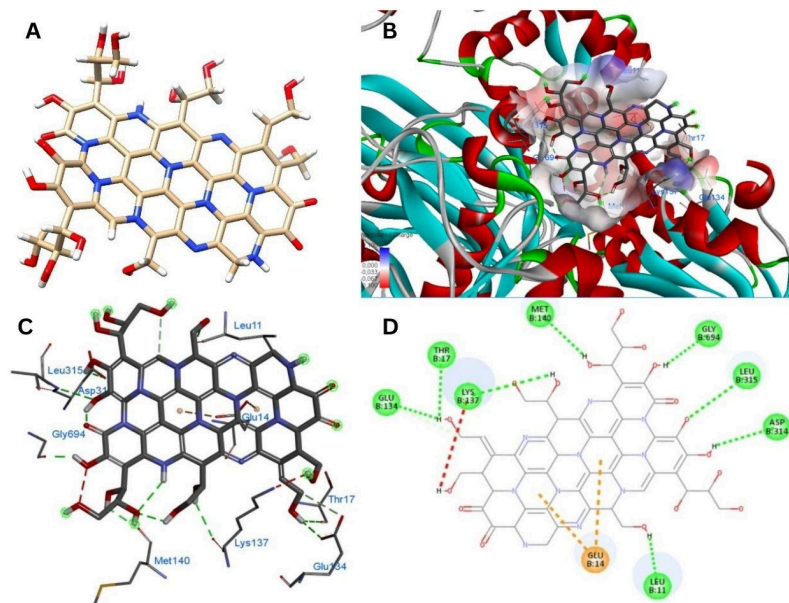


Рис. 3.1 - Наночастинки А без гадулінію у взаємодії з ФЛС- β у присутності Gqa. (А) Структури наночастинки в Chimera. (В) 3D-конфігурація докінгу наночастинки А з ФЛС- β , що показує найсприятливішу орієнтацію та зв'язувальну область у Discover Studio (DS). (С) Взаємодія наночастинки з амінокислотами в зв'язувальному сайті, створена у DS. (D) 2D-діаграма взаємодії ліганд-рецептор, що підкреслює різні типи зв'язків, створена у DS.

Гадолінієвий варіант наночастинки A(2Ga) продемонстрував чіткий профіль зв'язування із максимальним показником афінності -10,0 ккал/моль. На відміну від безгадулінових наночастинок, тут ми побачили, що основна частина можливих варіантів стикування була локалізована у проміжку між цільовим білком і альфа субодиницею. Ключові взаємодії включали TYR 264, SER:316, LEU B:700, ARG A:706 і GLU B:703, THR B:790. Ці взаємодії вказали на навіність як водневих зв'язків, а також вуглець-водневих зв'язків та взаємодії пі-катіонів. Важливо відзначити, що залишки GLU B:703 і ARG B:706, GLU B:703, THR B:790 є вирішальними для зв'язування в домені TIM, необхідні для каталітичної активності ферменту. А така взаємодія як TYR 264 вказує на зв'язування з доменом EF-hand. Гадолінієвий варіант наночастинки A демонструє унікальну роздвоєну структуру, що нагадує сендвіч, з гадолінієм, розташованим у центрі між двома різними вуглецевими каркасами. Загальна площа поверхні цієї наночастинки становить 1036,9 Å². З них 68,10% активно бере участь у взаємодії з білком. Крім того, 1,08% площі поверхні білка бере участь у зв'язуванні з наночастинкою.

Наночастинка B у своїй оптимізованій формі без гадолінію продемонструвала значну спорідненість зв'язування, досягнувши найвищого показника афінності -13,2 ккал/моль. Ця наночастинка взаємодіяла з декількома амінокислотами у B-ланцюзі ФЛС-β, включаючи ASN B:726, SER B:814, GLU B:703, ARG B:706, ARG B:707, GLU B:311, TYR B:264, LEU B:263, PRO B:309, ASN B:258, GLN B:321, THR B:320 і ASP B:318. Взаємодії склалися із водневих зв'язків, галогенних зв'язків за участі фтору, найпевніше через присутність трифторметилу в наночастинці B, і різних пі-взаємодій. Зокрема, залишки ASN B:258, TYR B:264 і LEU B:263 взаємодіють із доменом EF-hand, тоді як ASN B:726, SER B:814 зв'язуються з доменом C2. Крім того, залишки GLU B:703, ARG B:706, ARG B:707 допускають зв'язування в межах Y-компонента домену TIM, що є вирішальним для каталітичної діяльності.

взаємодії. Зокрема, залишки LYS B:278, ARG A:154 свідчать про зв'язування в домені EF-hands. Розрахована площа поверхні наночастинки В з гадолінієм становила $1411,3 \text{ \AA}^2$. Аналіз показує, що 57,50% площі поверхні наночастинки бере участь у взаємодії з білком. Крім того, 1,24% площі поверхні білка бере участь у взаємодії з наночастинкою.

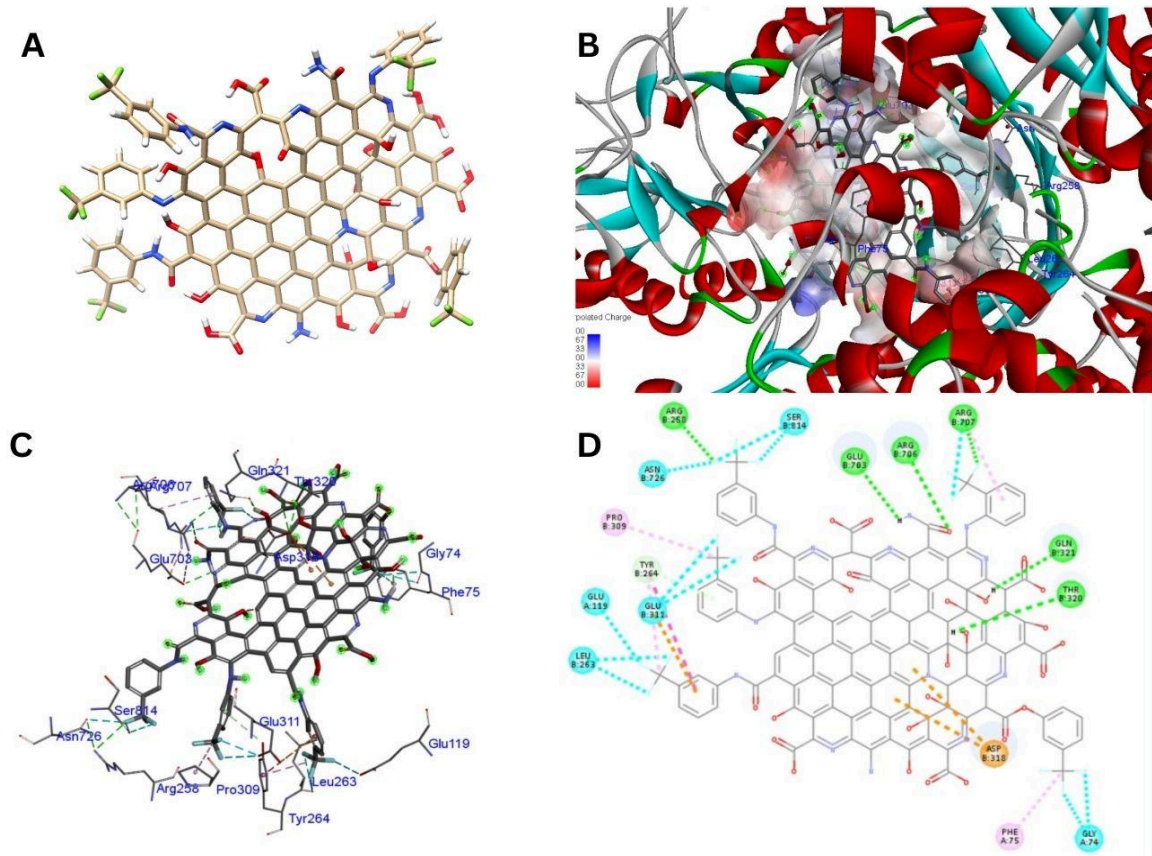


Рис. 3.3 - Наночастинки В без гадолінію у взаємодії з фосфоліпазою С бета у присутності Gqa. (A) Структури наночастинки в Chimera. (B) 3D-конфігурація докінгу наночастинки В з фосфоліпазою С бета, що показує найсприятливішу орієнтацію та зв'язувальну область у Discover Studio (DS). (C) Взаємодія наночастинки з амінокислотами в зв'язувальному сайті, створена у DS. (D) 2D-діаграма взаємодії ліганд-рецептор, що підкреслює різні типи зв'язків, створена у DS.

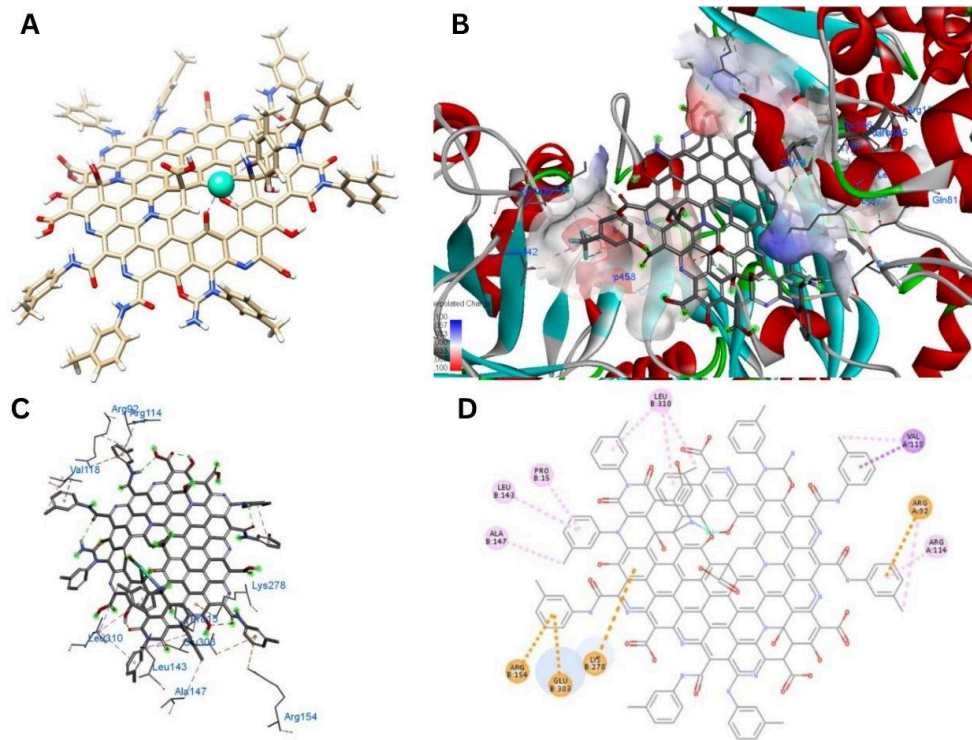


Рис. 3.4 - Наночастинки В з гадолінієм у взаємодії з фосфоліпазою С бета у присутності Gqa. (A) Структури наночастинки в Chimera. (B) 3D-конфігурація докінгу наночастинки В з гадолінієм з фосфоліпазою С бета, що показує найсприятливішу орієнтацію та зв'язувальну область у Discover Studio (DS). (C) Взаємодія наночастинки з амінокислотами в зв'язувальному сайті, створена у DS. (D) 2D-діаграма взаємодії ліганд-рецептор, що підкреслює різні типи зв'язків, створена у DS.

Оптимізована наночастинка С без гадолінію продемонструвала значну спорідненість зв'язування, досягнувши максимального показника афінності -13,1 ккал/моль. Взаємодії включали GLU A:115, ARG A:114, ARG A:92, ASP A:95, THR A:96 і ARG B:268. Ці взаємодії включали водневі зв'язки, пі-сигма та пі-катіонні взаємодії. Зокрема, залишки такі як ARG B:268 вказує на потенційне зв'язування в межах домен EF-hand. Визначено, що площа поверхні наночастинки С становить $961,87 \text{ \AA}^2$. З них 52,50% бере участь у взаємодії з білком. Крім того, 0,77% площі поверхні білка бере участь у цій взаємодії з наночастинкою.

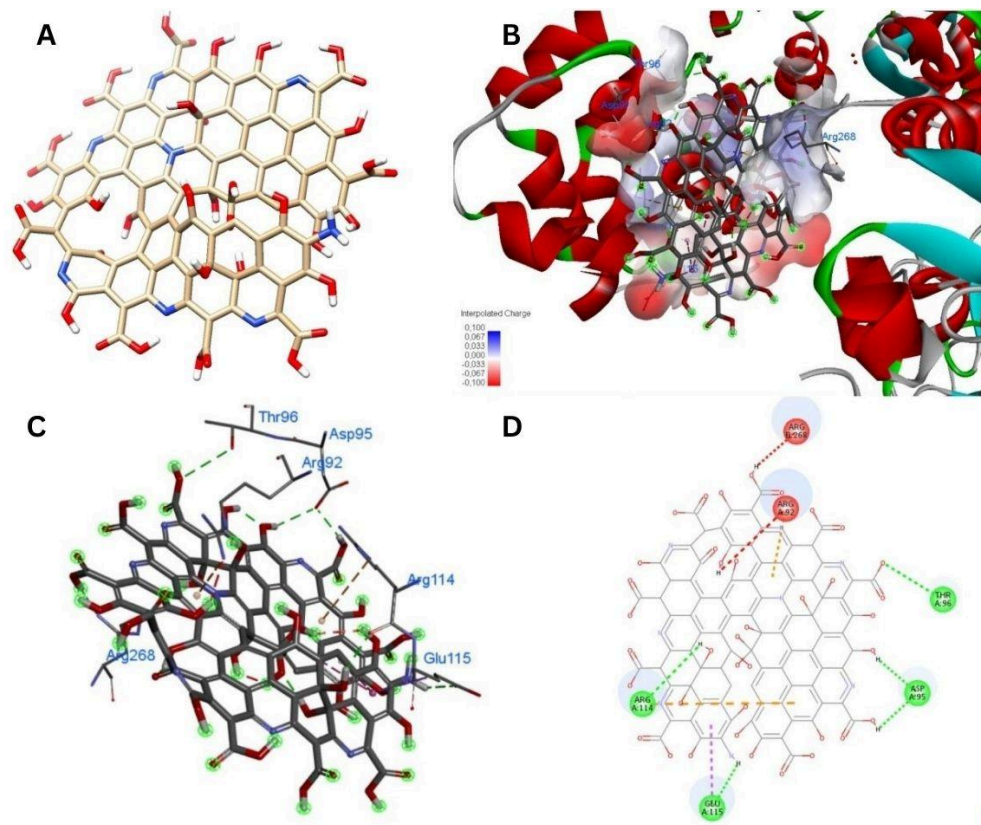


Рис. 3.5 - Наночастинки С без гадолінію у взаємодії з фосфоліпазою С бета у присутності Gqa. (A) Структури наночастинки в Chimera. (B) 3D-конфігурація докінгу наночастинки С з фосфоліпазою С бета, що показує найсприятливішу орієнтацію та зв'язувальну область у Discover Studio (DS). (C) Взаємодія наночастинки з амінокислотами в зв'язувальному сайті, створена у DS. (D) 2D-діаграма взаємодії ліганд-рецептор, що підкреслює різні типи зв'язків, створена у DS.

Наночастинки С з гадолінієм продемонстрував взаємодію з ASP B:318, SER B:316, THR B:320, GLN B:321, ARG B:706, GLU B:703, TYR B:264, ALA B:815, THR B:790. Ці взаємодії включали водневі зв'язки, пі-аніони та вуглець-водневі зв'язки. Залишки ARG B:706 і GLU B:703 вказують на значне зв'язування у межах домену ТІМ, тоді як ALA B:815 і THR B:790 припускають взаємодії в межах домену С2. Площа поверхні наночастинки С з гадолінієм становить $1008,8 \text{ \AA}^2$. З них 59,80% бере участь у взаємодії з

білком. Крім того, 0,92% площі поверхні білка бере участь у зв'язуванні з наночастинкою

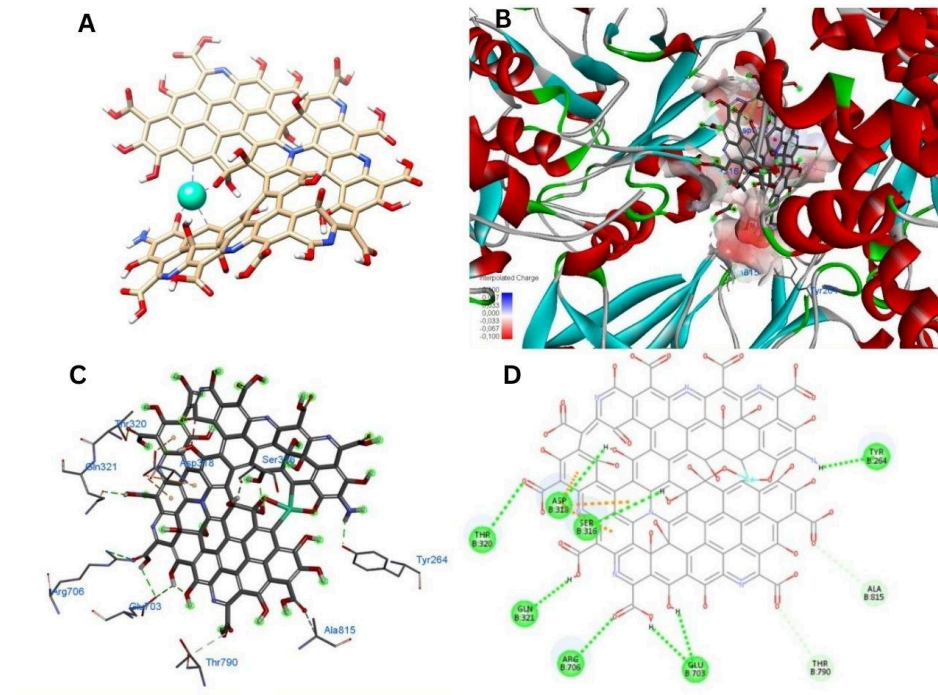


Рис. 3.6 - Наночастинки C з гадолінієм у взаємодії з фосфоліпазою C бета у присутності Gqa. (A) Структури наночастинки в Chimera. (B) 3D-конфігурація докінгу наночастинки C з гадолінієм з фосфоліпазою C бета, що показує найсприятливішу орієнтацію та зв'язувальну область у Discover Studio (DS). (C) Взаємодія наночастинки з амінокислотами в зв'язувальному сайті, створена у DS. (D) 2D-діаграма взаємодії ліганд-рецептор, що підкреслює різні типи зв'язків, створена у DS.

Оптимізована наночастинка D без гадолінію показала значну афінність зв'язування з максимальним показником -13,1 ккал/моль. Навіть попри те, що максимальний скор є доволі високим, локалізація наночастинок в цьому випадку було доволі хаотичне у порівнянні з попередніми. Ця наночастинка взаємодіяла з кількома амінокислотами, включаючи MET B:460, LYS A:77, LYS A:120, GLN B:457, ASP A:71, GLU A:70, PHE A:194, ILE A:56, ARG A:60, TYR A:192 і LYS A:57. Ці взаємодії охоплювали пі-сірчані, пі-катионні,

алкільні та водневі зв'язки. Залишки MET B:460 та GLN B:457 пов'язані з ТІМ домен. Загальна площа поверхні наночастинки D становить 1605,2 Å². З них 51,1% бере участь у взаємодії з білком. Крім того, 1,26% площі поверхні білка бере участь у зв'язуванні з наночастинкою.

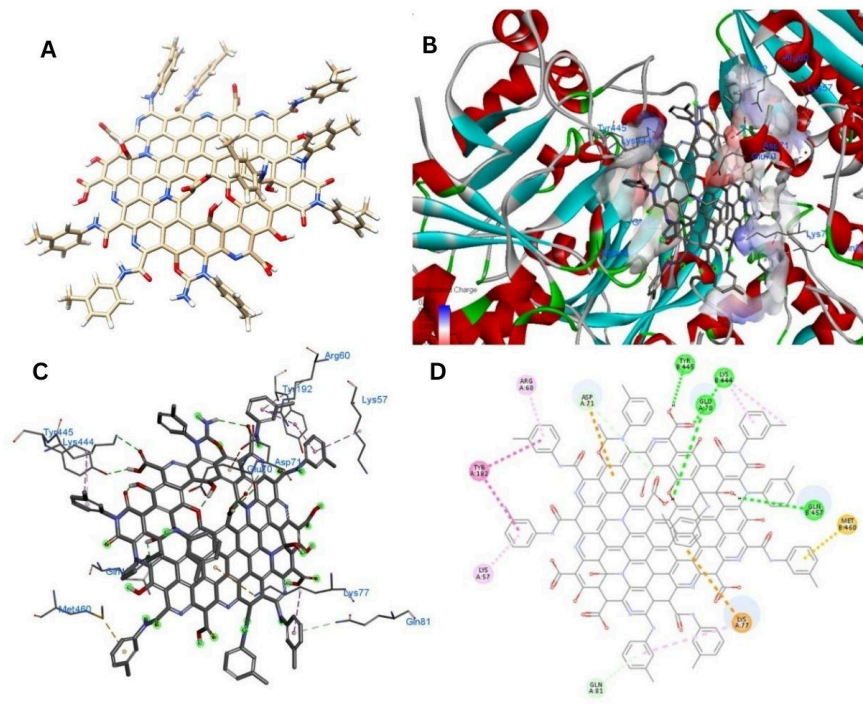


Рис. 3.7 - Наночастинки D без гадолінію у взаємодії з фосфоліпазою C бета у присутності Gqa. (A) Структури наночастинки в Chimera. (B) 3D-конфігурація докінгу наночастинки D з фосфоліпазою C бета, що показує найсприятливішу орієнтацію та зв'язувальну область у Discover Studio (DS). (C) Взаємодія наночастинки з амінокислотами в зв'язувальному сайті, створена у DS. (D) 2D-діаграма взаємодії ліганд-рецептор, що підкреслює різні типи зв'язків, створена у DS.

Гадолінієвий варіант наночастинки D продемонстрував високу афінність зв'язування з максимальним показником -12,3 ккал/моль. Взаємодія включає залишки GLU B:303, ARG A:154, LYS B:278, LEU B:274, LEU B:143, ALA B:147, PRO B:15, LEU B:310, ARG B:817, VAL A:118, ARG A:92, ARG A:114 і GLU A:115. Ці взаємодії включали пі-аніони, пі-катіони та водневі

зв'язки. Зокрема, залишки LEU B:274, ARG A:154 і LYS B:278 вказують на зв'язування в домені EF-hands. Натомість залишки ARG A:92, ARG A:114 і GLU A:115 вказують на зв'язок у домені PH. Загальна площа поверхні наночастинки D, що містить гадоліній, становить 1671,3 Å². При цьому 48,2% площі поверхні наночастинки взаємодіє з білком. Також було розраховано, що 1,23% площі поверхні білка бере участь у зв'язуванні з наночастинкою.

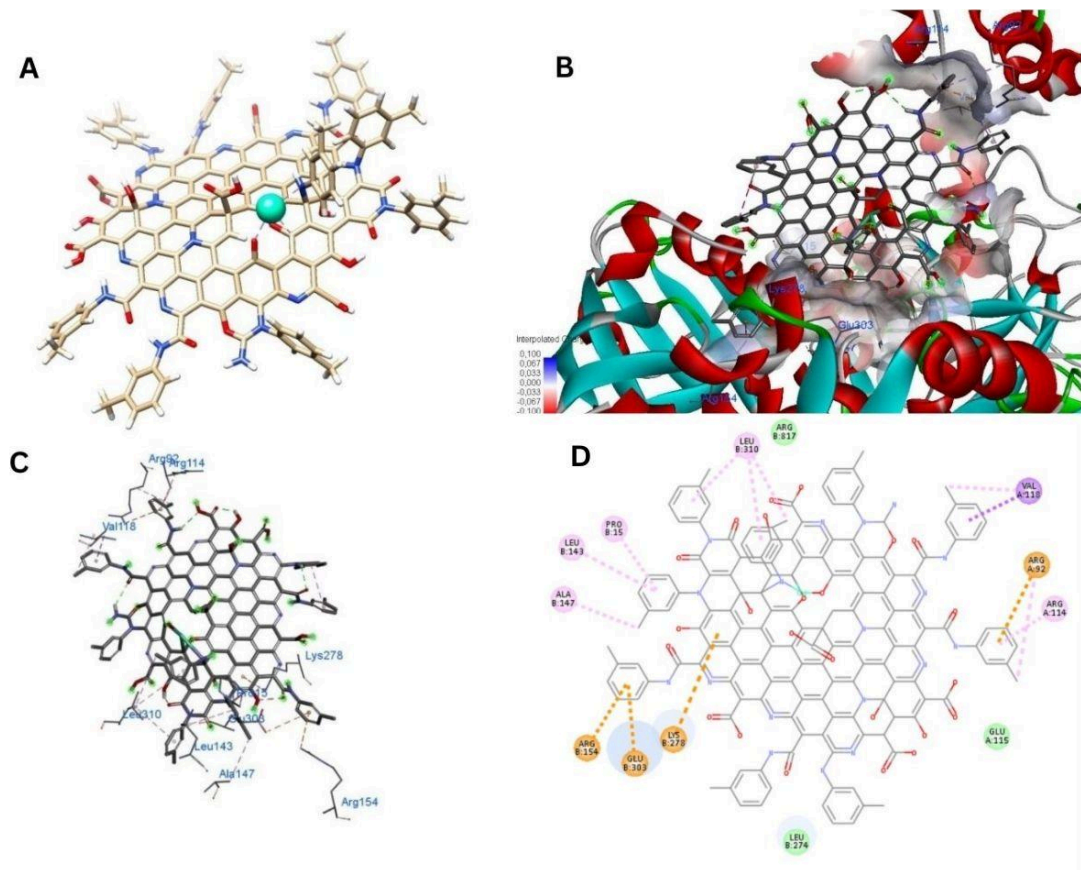


Рис. 3.8 - Наночастинки D з гадолінієм у взаємодії з фосфоліпазою C бета у присутності Gqa. (A) Структури наночастинки в Chimera. (B) 3D-конфігурація докінгу наночастинки D з гадолінієм з фосфоліпазою C бета, що показує найсприятливішу орієнтацію та зв'язувальну область у Discover Studio (DS). (C) Взаємодія наночастинки з амінокислотами в зв'язувальному сайті, створена у DS. (D) 2D-діаграма взаємодії ліганд-рецептор, що підкреслює різні типи зв'язків, створена у DS.

3.2. Дослідження та результати молекулярних взаємодій між фосфоліпазою С бета та наночастинками з гадолінієм та без нього після виключення субодиниці Gqa

Після початкових висновків друга фаза нашого дослідження включала докинг тих самих наночастинок без субодиниці Gqa для оцінки потенційного конкурентного зв'язування та алостеричної модуляції. Ця фаза мала на меті визначити, чи можуть наночастинок конкурувати з субодиницею Gqa за сайти зв'язування на ФЛС- β або індукувати алостеричні ефекти, які можуть впливати на конформацію та активність білка. Для другої частини нашої роботи площа поверхні фосфоліпази С бета була зображена 50499,0 Å.

Оптимізована наночастинка А без гадолінію продемонструвала високу афінність зв'язування з максимальним показником -10,6 ккал/моль. Ця наночастинка взаємодіяла з кількома амінокислотами в В-ланцюзі ФЛС- β , включаючи GLU В:134, LYS В:137, MET В:140, LEU В:11, GLU В:14, ASP В:314, LEU В:315 і GLY В:694. Ці взаємодії включали водневі зв'язки, вуглець-водневі зв'язки та взаємодії пі-аніонів. Зокрема, залишки GLU В:134, LYS В:137, MET В:140 взаємодіють з доменом PH, тоді як GLY В:694 взаємодіє з доменом TIM. Наночастинка А без гадолінію взаємодіє з білком таким чином, що 73,9% її поверхні бере участь у цій взаємодії. При цьому 0,99% поверхні білка залучено у взаємодію з наночастиною.

Гадолінієвий варіант наночастинки А продемонстрував взаємодію з PRO В:832, PRO В:110, GLN В:831, THR В:63, GLN В:163, LYS В:159, VAL В:806, GLU В:828, ASP В:65, SER В:67, ASN В:827 досягнувши максимального скору афінності -8,3 ккал/моль. Ці взаємодії включали водневі зв'язки, вуглець-водневі зв'язки та взаємодії пі-катионів. Залишки GLU В:703 і ARG В:706 є вирішальними для зв'язування в домені TIM, необхідних для каталітичної активності ферменту.

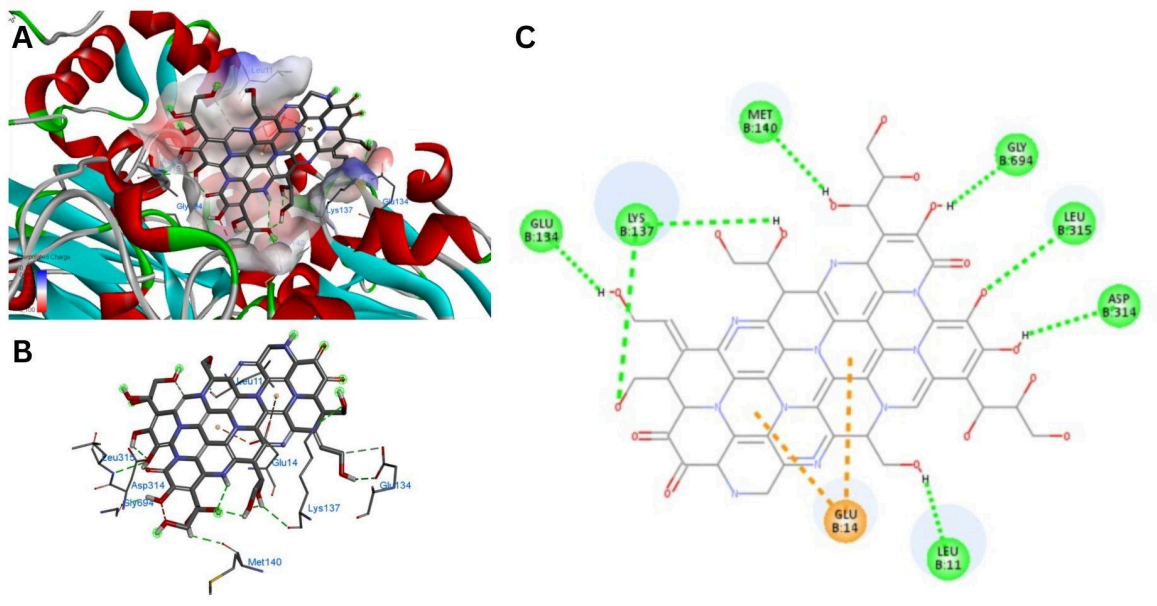


Рис. 3.9 - Наночастинки А без гадолінію у взаємодії з ФЛС-β з видаленою субодиницею Gqa. (А) 3D-конфігурація докінгу наночастинки А з ФЛС-β, що показує найсприятливішу орієнтацію та зв'язувальну область у Discover Studio (DS). (В) Взаємодія наночастинки з амінокислотами в зв'язувальному сайті, створена у DS. (С) 2D-діаграма взаємодії ліганд-рецептор, що підкреслює різні типи зв'язків, створена у DS.

Такі взаємодії, як ILE A:189, GLN B:163, LYS B:159 і VAL A:184, вказують на зв'язування з доменом EF-hand. Такі залишки як ASP B:65, SER B:67, PRO B:110 вказують на зв'язування з PH доменом, а PRO B:832, GLN B:831, ASN B:827 і B:806 вказують на зв'язування з C2 доменом. Було розраховано, що 58,20% наночастинка А з гадолінієм взаємодіє з білком. При цьому 1,20% поверхні білка залучено у взаємодію з наночастинкою.

Оптимізована наночастинка В без гадолінію продемонструвала максимальну оцінку афінності з показником -11,2 ккал/моль. Ця наночастинка взаємодіяла з кількома амінокислотами в В-ланцюзі ФЛС-β, включаючи GLU B:34, THR B:344, THR B:385, GLU B:386, THR B:384, MET B:383, ARG B:369, GLU B:372, LYS B:62, ALA B:78, TYR B:77, ARG B:351, ARG B:79, PHE B:117, THR B:115.

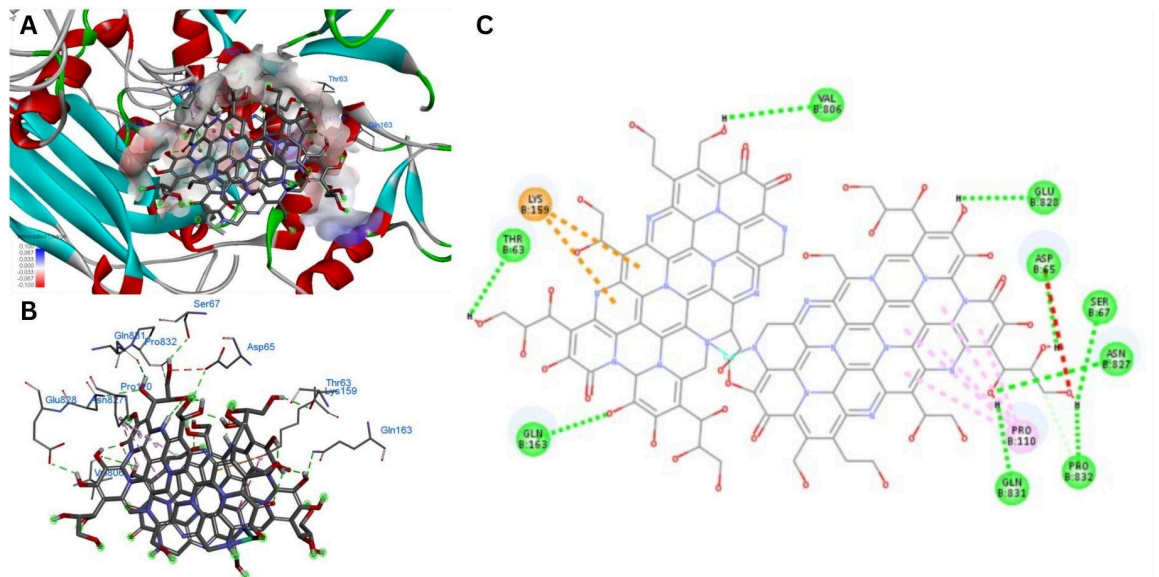


Рис. 3.10 - Наночастинки А з гадолінієм у взаємодії з ФЛІС-β з видаленою субодиницею Gqa. (А) 3D-конфігурація докінгу наночастинки А з гадолінієм з ФЛІС-β, що показує найсприятливішу орієнтацію та зв'язувальну область у Discover Studio (DS). (В) Взаємодія наночастинки з амінокислотами в зв'язувальному сайті, створена у DS. (С) 2D-діаграма взаємодії ліганд-рецептор, що підкреслює різні типи зв'язків, створена у DS.

Ці взаємодії склалися з водневих зв'язків, галогенних зв'язків за участю фтору та різноманітних пі-взаємодій. Залишки LYS B:62, ALA B:78, TYR B:77, GLU B:34, ARG B:79, PHE B:117, THR B:115 взаємодіють з PH доменом. Крім того, інша половина залишків припускають зв'язування в межах X-компоненти домену TIM. Наночастинка В без гадолінію взаємодіє з білком таким чином, що 48,60% її поверхні бере участь у цій взаємодії. При цьому 1,36% поверхні білка залучено у взаємодію з наночастинкою.

Гадолінієвий варіант наночастинки В продемонстрував сильну афінність зв'язування з максимальним показником -12,0 ккал/моль. Взаємодії включали PRO B:16, ALA B:147, THR B:151, SER B:148, LEU B:310, ARG B:817, LEU B:143, ALA B:144, GLU B:303, PRO B:15, SER B:270, LEU B:274, GLN B:271, ARG B:268, TYR B:264, LEU B:259.

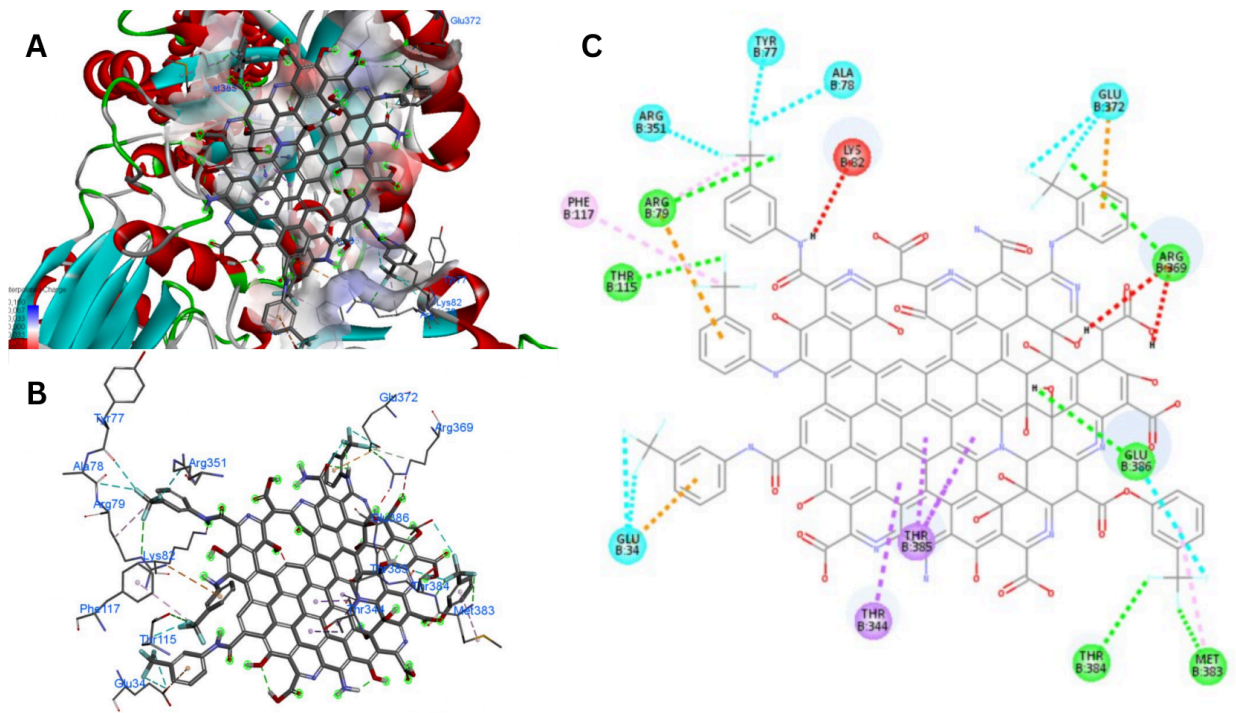


Рис. 3.11 - Наночастинки В без гадолінію у взаємодії з ФЛС- β з видаленою субодиницею Gqa. (А) 3D-конфігурація докінгу наночастинки В без гадолінію з ФЛС- β , що показує найсприятливішу орієнтацію та зв'язувальну область у Discover Studio. (В) Взаємодія наночастинки з амінокислотами в зв'язувальному сайті, створена у DS. (С) 2D-діаграма взаємодії ліганд-рецептор, що підкреслює різні типи зв'язків, створена у DS.

Ці взаємодії включали пі-аніони, пі-катіони та алкільні взаємодії. Зокрема, залишки В:270, LEU В:274, GLN В:271, ARG В:268, TYR В:264, LEU В:259 і THR В:151 вказують на зв'язування в домені EF-hands, тоді як залишок ARG В:817 вказує на взаємодію в домені С2. Наночастинка В з гадолінієм взаємодіє з білком, при цьому 54,30% поверхні наночастинки бере участь у цій взаємодії. Крім того, 1,52% поверхні білка залучено у взаємодію з наночастинкою.

Оптимізована наночастинка С без гадолінію продемонструвала високу афінність зв'язування з максимальним показником -12,1 ккал/моль.

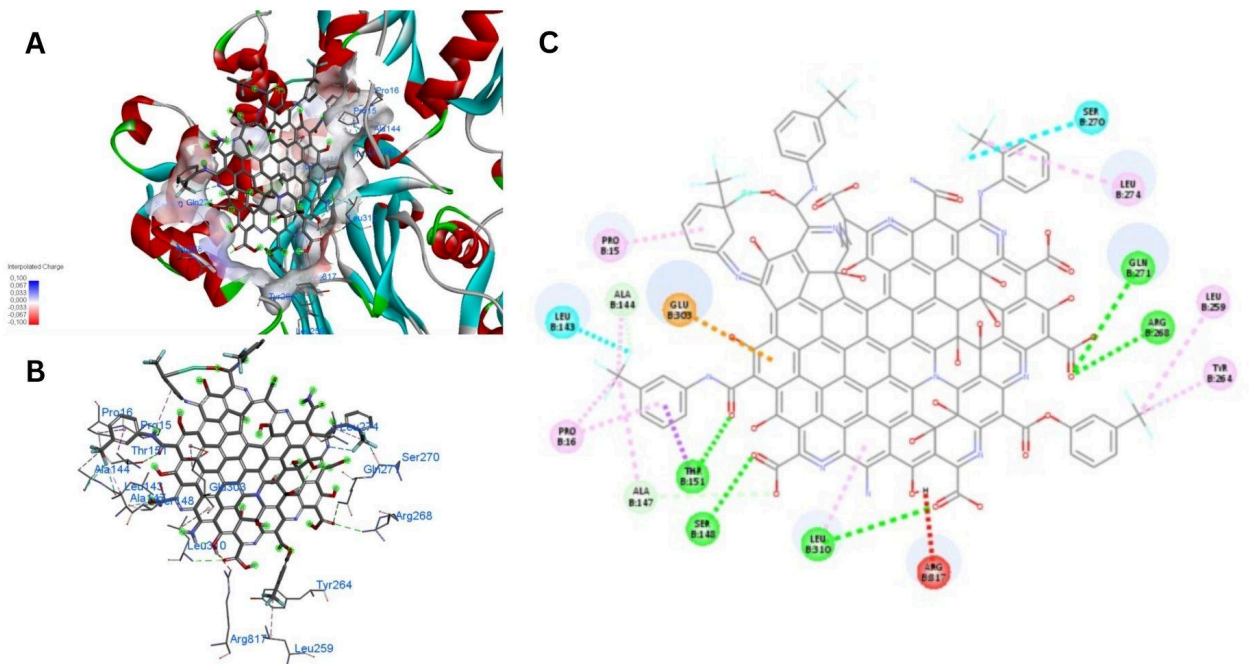


Рис. 3.12 - Наночастинки В з гадолієм у взаємодії з ФЛІС-β з видаленою субодиницею Gqa. (А) 3D-конфігурація докінгу наночастинки В з гадолієм з ФЛІС-β, що показує найсприятливішу орієнтацію та зв'язувальну область у Discover Studio. (В) Взаємодія наночастинки з амінокислотами в зв'язувальному сайті, створена у DS. (С) 2D-діаграма взаємодії ліганд-рецептор, що підкреслює різні типи зв'язків, створена у DS.

Взаємодії включали ARG B:76, ASP B:391, ARG B:351, ARG B:79, LYS B:82, GLU B:346, GLU B:386, THR B:385, PRO B:388. Ці взаємодії включали водневі зв'язки, пі-сигма та пі-катіонні взаємодії. Залишки ARG B:76, ARG B:79 і LYS B:82 свідчать про значне зв'язування в домені PH, тоді як ASP B:391, ARG B:351, GLU B:346, GLU B:386, THR B:385 і PRO B:388 вказує на потенційне зв'язування в межах X-компоненти домену TIM. Наночастинка С без гадолінію взаємодіє з білком, при цьому 51,20% поверхні наночастинки бере участь у цій взаємодії. На додаток, 0,98% поверхні білка залучено у взаємодію з наночастинкою.

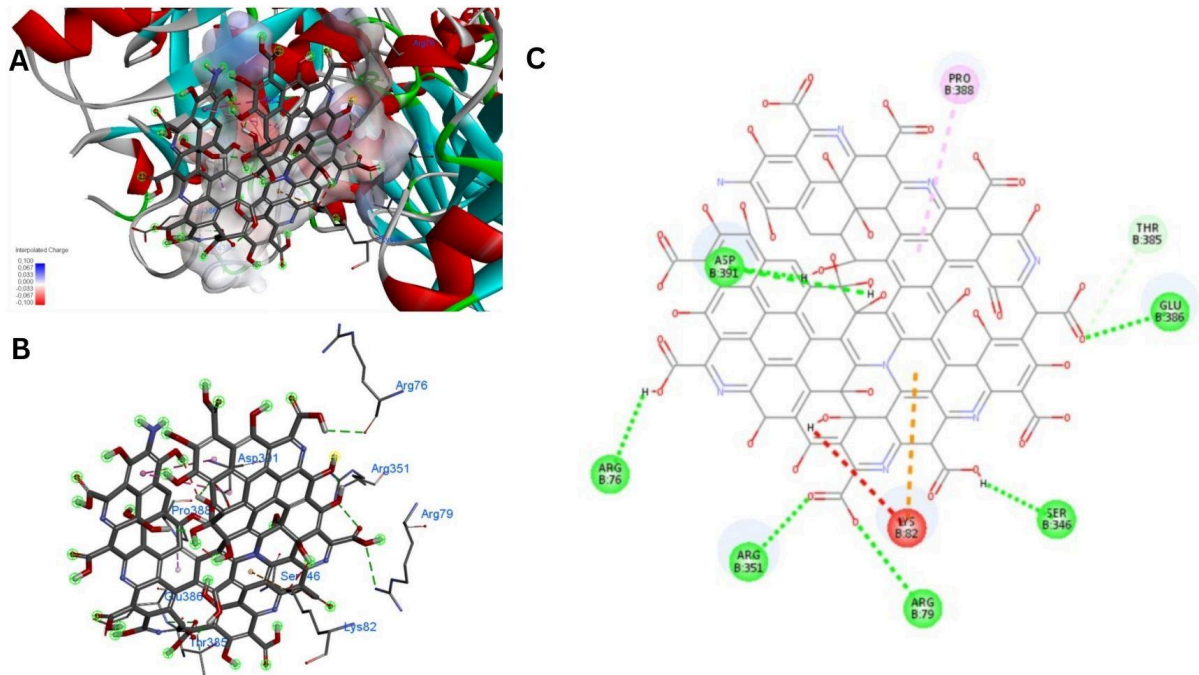


Рис. 3.13 - Наночастинки С без гадолінію у взаємодії з ФЛС- β з видаленою субодиницею Gqa. (А) 3D-конфігурація докінгу наночастинки С без гадолінію з ФЛС- β , що показує найсприятливішу орієнтацію та зв'язувальну область у Discover Studio. (В) Взаємодія наночастинки з амінокислотами в зв'язувальному сайті, створена у DS. (С) 2D-діаграма взаємодії ліганд-рецептор, що підкреслює різні типи зв'язків, створена у DS.

Гадолінієвий варіант наночастинки С продемонстрував взаємодію з MET В:460, PHE В:401, PRO В:405, MET В:140, GLU В:133, GLU В:461 досягнувши максимального скору афінності -13,8 ккал/моль. Ці взаємодії включали звичайні водневі зв'язки, пі-алкільні та пі-аніонні зв'язки. Залишки MET В:460, PHE В:401, PRO В:405 і GLU В:461 вказують на значне зв'язування в межах домену TIM, тоді як MET В:140 і GLU В:133 припускають взаємодії в межах PH домену. Наночастинка С з гадолінію взаємодіє з білком, при цьому 51,20% поверхні наночастинки бере участь у цій взаємодії. Крім того, 0,98% поверхні білка залучено у взаємодію з наночастинкою.

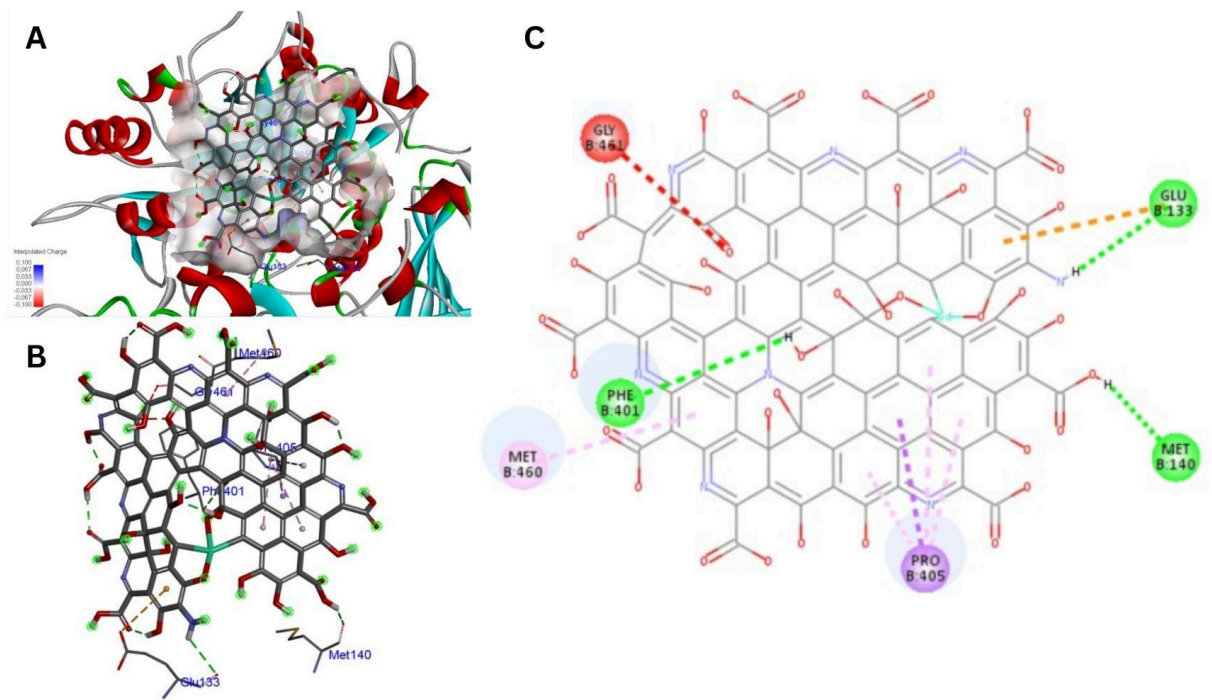


Рис. 3.14 - Наночастинки С з гадолінієм у взаємодії з ФЛІС- β з видаленою субодиницею Gqa. (А) 3D-конфігурація докінгу наночастинки С з гадолінієм з ФЛІС- β , що показує найсприятливішу орієнтацію та зв'язувальну область у Discover Studio. (В) Взаємодія наночастинки з амінокислотами в зв'язувальному сайті, створена у DS. (С) 2D-діаграма взаємодії ліганд-рецептор, що підкреслює різні типи зв'язків, створена у DS.

Оптимізована наночастинка D без гадолінію показала значну афінність зв'язування з максимальним показником $-10,4$ ккал/моль. Ця наночастинка взаємодіяла з кількома амінокислотами, включаючи ARG B:390, ARG B:369, PRO B:371, GLU B:372, SER B:345, SER B:346, ARG B:79, LYS B:82, ARG B:351, ARG B:76, ASP B:391. Ці взаємодії включали пі-сірчані, пі-катионні, алкільні та водневі зв'язки. Залишки B:79, LYS B:82 і ARG B:76 вказують на зв'язування в домені PH, тоді як всі інші залишки вказує на потенційне зв'язування в межах X-компоненти домену TIM. Наночастинка D без гадолінію взаємодіє з білком, при цьому 36,30% поверхні наночастинки залучено до цієї взаємодії. Крім того, 1,15% поверхні білка бере участь у взаємодії з наночастинкою.

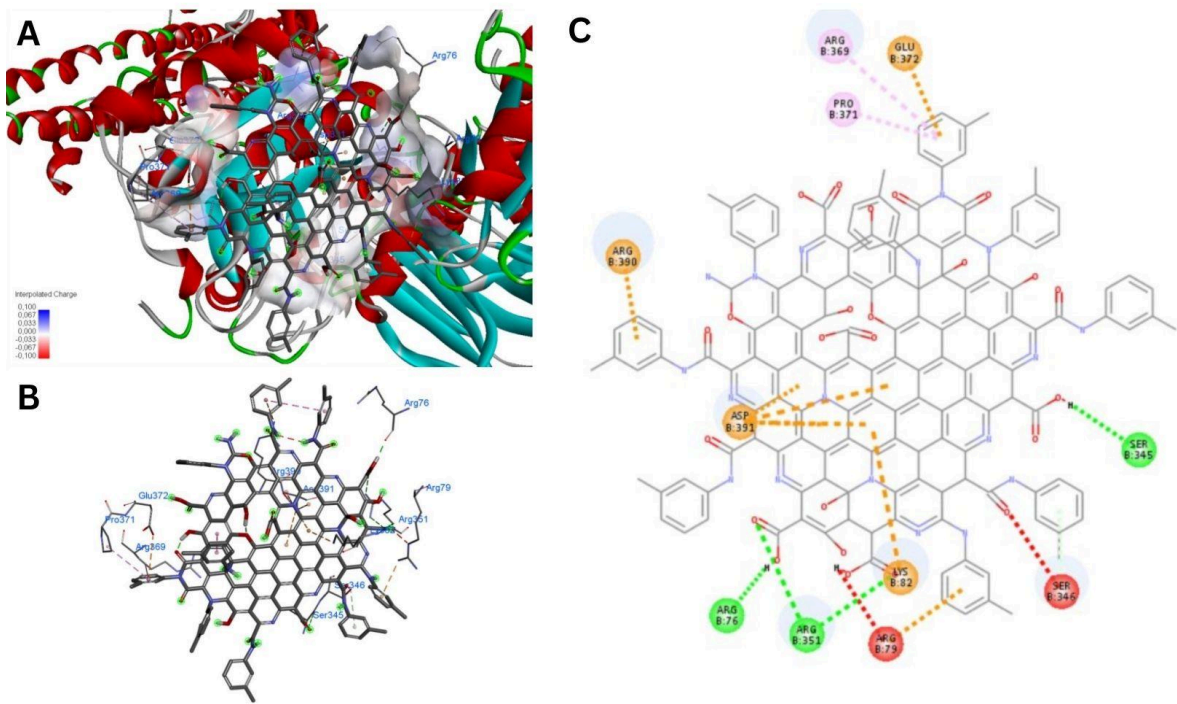


Рис. 3.15 - Наночастинки D без гадолінію у взаємодії з ФЛС- β з видаленою субодиницею Gqa. (A) 3D-конфігурація докінгу наночастинки D без гадолінію з ФЛС- β , що показує найсприятливішу орієнтацію та зв'язувальну область у Discover Studio. (B) Взаємодія наночастинки з амінокислотами в зв'язувальному сайті, створена у DS. (C) 2D-діаграма взаємодії ліганд-рецептор, що підкреслює різні типи зв'язків, створена у DS.

Гадолінієвий варіант наночастинки D продемонстрував високу афінність зв'язування з максимальним показником $-11,1$ ккал/моль. Взаємодія включає залишки ALA B:448, ASN B:612, LYS B:610, GLN B:642, PRO B:708, PRO B:322, PRO B:452, TYR B:445, LYS B:444, VAL B:451. Ці взаємодії включали пі-алкільні, пі-катіони та водневі зв'язки. Залишки ALA B:448, PRO B:452, TYR B:445, LYS B:444, VAL B:451 вказують на зв'язування з X-компонентою домену TIM. Натомість залишки ASN B:612, LYS B:610, GLN B:642, PRO B:708 вказують на зв'язування з Y-компонентою домену TIM. Наночастинка D з гадолінієм взаємодіє з білком, при цьому 35.30% поверхні наночастинки залучено до цієї взаємодії. Крім того, 1,17% поверхні білка бере участь у взаємодії з наночастинкою.

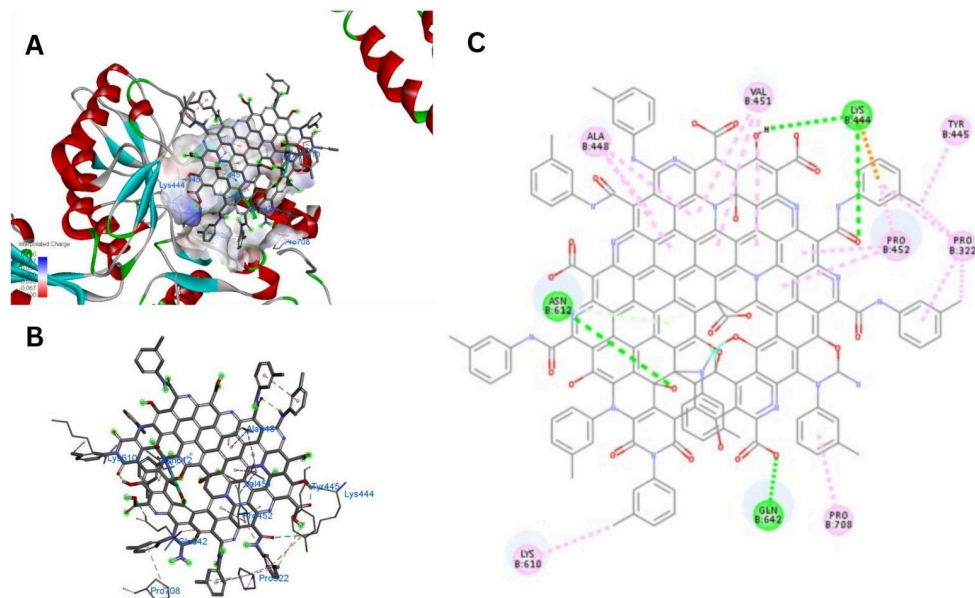


Рис. 3.16 - Наночастинки D з гадолінієм у взаємодії з ФЛС-β з видаленою субодиноцею Gqa. (A) 3D-конфігурація докінгу наночастинки D з гадолінієм з ФЛС-β, що показує найсприятливішу орієнтацію та зв'язувальну область у Discover Studio. (B) Взаємодія наночастинки з амінокислотами в зв'язувальному сайті, створена у DS. (C) 2D-діаграма взаємодії ліганд-рецептор, що підкреслює різні типи зв'язків, створена у DS.

Підсумовуючи все вищесказане, можна зробити висновок, що формування водневих зв'язків прослідковувалася найчастіше, що значно сприяє стабільності зв'язування в усіх експериментах. Пі-взаємодії, особливо пі-катіон і пі-аніон, є вирішальними для посилення специфічності та спорідненості зв'язування, особливо у варіантах, що містять гадоліній. Галогенні зв'язки, зокрема за участю фтору, значно переважають у наночастинці B через наявність трифторметильних груп. Грунтуючись на всебічному аналізі досліджень молекулярного докінгу, очевидно, що певні амінокислоти демонструють більш високу частоту взаємодій з функціоналізованими наночастинками вуглецевої точки, як з гадолінієм, так і без нього. Зокрема, аргінін (ARG) є амінокислотою, яка найчастіше взаємодіє, у 3 із 4 випадків наночастинок. Однак, для наночастинок A

найбільш поширеною є глутамінова кислота (GLU). Якщо розглядати всі наночастинки разом, то глутамінова кислота (GLU) виявляється найбільш часто спостережуваною амінокислотою сумарно. Це свідчить про те, що GLU та ARG мають сильну спорідненість до зв'язування з цими наночастинками, хоча статистична значущість цих результатів потребує подальшого підтвердження.

Початкові експерименти, що включали субодиночку Gqa, продемонстрували, що більшість докованих наночастинок локалізувалися в проміжку між Gqa та білком ФЛС- β , що дозволило висунути гіпотезу про їх можливе функціонування як конкурентних інгібіторів. Проте, після виключення субодиночки Gqa розташування наночастинок стало помітно невпорядкованим. Це підштовхнуло до розгляду алостеричних сайтів у ФЛС- β , частково описаних у літературі. Зокрема, було показано, що домен плекстрин-гомології (PH) ФЛС- β взаємодіє з ГТФазами, такими як Rac1, оптимізуючи орієнтацію ферменту відносно субстратних мембран і підвищуючи його каталітичну ефективність [44]. Крім того, домени EF-hand і каталітичний домен ТІМ сприяють регуляції ферменту, забезпечуючи точний контроль над його активністю [45]. Проведене дослідження особливо підкреслило часті взаємодії з доменом ТІМ, в якому міститься каталітичний центр ФЛС- β . Крім того, часті взаємодії спостерігалися з доменом PH. Роль домену PH у ФЛС- β включає зв'язування з мембранними ліпідами та взаємодію з регуляторними білками, такими як малі GTPase, зокрема Rac1. Цей домен має вирішальне значення для правильної локалізації та орієнтації ФЛС- β на межі мембрани, сприяючи ефективному каталізу. Взаємодії з доменом PH, які спостерігалися в дослідженні, узгоджуються з результатами інших робіт, що підкреслюють значення цього домену в активації та регулюванні [46].

Дослідження *in vivo* та *in vitro* продемонстрували, що тканини гладеньких м'язів щурів, яким вводили суспензії органічних нанокompatитів, як з Gd^{3+} , так і без нього, демонстрували значні зміни в скоротливій

активності. Зокрема, за ін'єктування органічних нанокompatитів з Gd^{3+} вдвічі збільшувалася сила тонічних компонентів карбахолін-активованих скорочень гладеньких м'язів товстого кишечника та утричі – шлунку; фазні компоненти за цих умов були на рівні контролю. За аналогічних умов присутність в організмі тварин вільних від Gd^{3+} нанокompatитів супроводжувалася зростанням фазних компонентів карбахолін-активованих скорочень м'язів шлунку і товстого кишечника втричі, а тонічних - вдвічі щодо контрольних.

Це значне посилення сили перш за все фазових скорочень передбачає домінантне посилення сигналізації через мускаринові ацетилхолінові рецептори підтипу М3. Активація цих рецепторів викликає Gq/11-опосередковану білком стимуляцію ФЛС- β , що призводить до виробництва вторинних месенджерів ДАГ та ІТФ. Дифузія IP3 до саркоплазматичного ретикулуму та подальше відкриття IP3-чутливих Ca^{2+} каналів сприяє фазовому компоненту індукованих карбахоліном скорочень.

Враховуючи малий розмір обох типів нанокompatитів (4-6 нм), їх здатність долати ендотеліальні бар'єри, міжклітинні матриці та проникати в клітини є високоймовірною. Це свідчить про те, що наночастинки можуть націлюватися не лише на мембранно-зв'язані білки, але й на цитоплазматичні, зокрема ті білки, що знаходяться біля мембрани, такі як ФЛС- β . Наші результати докінгу підтверджують цю гіпотезу, вказуючи на те, що як Gd^{3+} -функціоналізовані, так і Gd^{3+} -вільні наночастинки можуть утворювати комплекси з вільними молекулами ФЛС- β та їх комплекси з α -субодиницями білків Gq/11. Утворення таких комплексів може посилити ферментативну активність ФЛС- β та/або змінити кінетику дисоціації α -субодиниці, що призведе до підвищення загальної активності ФЛС- β та посиленого IP3-опосередкованого вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму.

Тому, узагальнюючи результати наших досліджень *in silico*, дані експериментів *in vivo* та інформацію про структурні характеристики сайтів взаємодії алостеричних активаторів фосфоліпази С бета, можна передбачити,

що один із можливих механізмів, за допомогою якого наночастинки викликають підвищення у передачі сигналів мускаринових холінергічних рецепторів відбувається через алостеричну активацію фосфоліпази С бета цими нанокompозитами.

ВИСНОВКИ

1. Гадоліній-вмісні нанокompозити показали енергії зв'язування у діапазоні від -10,0 до -14,1 ккал/моль. Найкращий результат був досягнутий частинкою С з гадолінієм з найвищим показником афінності -14,1 ккал/моль, що свідчить про значний рівень стабільності та специфічності взаємодії з фосфоліпазою С бета. Найгірший результат продемонструвала частинка А без гадуліні, а саме найвищим показником афінності -10,0 ккал/моль, що можна пояснити меншою площею поверхні взаємодії та відповідно меншою кількістю водневих зв'язків.
2. Наночастинки без гадолінію мають енергії зв'язування в діапазоні від -10,6 до -13,2 ккал/моль. Найкраще зв'язана частинка В із показником афінності -13,2 ккал/моль, що підкреслює важливість структурних характеристик та хімічних груп для стабільності комплексу. Найгірший результат показала частинка А без гадолінію з найвищим показником афінності -10,6 ккал/моль.
3. При виключенні субодиниці Gqa, результати докінгу показали значні зміни в енергіях зв'язування, що свідчить про важливу роль цієї субодиниці у стабілізації комплексів. Зокрема, частинка А без Gd показала зниження афінності з -10,7 до -8,3 ккал/моль.
4. Аналіз сайтів зв'язування показав, що домени TIM і PH були найчастіше представлені серед сайтів зв'язування наночастинок. Взаємодії з аргініном (ARG) та глутаміновою кислотою (GLU) підкреслюють важливість цих амінокислот у формуванні стабільних хімічних зв'язків, які сприяють стабілізації комплексів.
5. Дослідження *in vivo* та *in vitro* підтвердили, що введення гадоліній-органічних нанокompозитів щурам сприяє посиленню скорочень гладеньких м'язів шлунка та товстого кишечника. Органічні нанокompозити без гадолінію збільшували фазні компоненти скорочень

до 283,2%, тоді як нанокompозити з гадолінієм підвищували ці скорочення до 184,9%, залишаючи амплітуду тонічних компонентів на рівні контролю. Це можна пояснити домінуючим посиленням сигналіngu через мускаринові ацетилхолінові рецептори М3-підтипу, що призводить до активації Gq/11-протеїнів, які стимулюють PLC β , підвищуючи рівень вторинних месенджерів ДАГ та ІТФ. У результаті, це спричиняє відкривання ІТФ-чутливих Ca²⁺-каналів, що формують фазний компонент карбахолінових скорочень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Minhas, A. S., & Oliver, R. (2022). Magnetic Resonance Imaging Basics. In *Advances in experimental medicine and biology* (pp. 47–82). https://doi.org/10.1007/978-3-031-03873-0_3
2. Chianca, V., Albano, D., Messina, C., Cinnante, C. M., Triulzi, F. M., Sardanelli, F., & Sconfienza, L. M. (2017). Diffusion tensor imaging in the musculoskeletal and peripheral nerve systems: from experimental to clinical applications. *European Radiology Experimental*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/s41747-017-0018-1>
3. Si, G., Du, Y., Tang, P., Ma, G., Jia, Z., Zhou, X., Mu, D., Shen, Y., Lu, Y., Mao, Y., Chen, C., Li, Y., & Gu, N. (2024). Unveiling the next generation of MRI contrast agents: current insights and perspectives on ferumoxytol-enhanced MRI. *National Science Review/National Science Review*. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwae057>
4. Kanal, E., Maravilla, K., & Rowley, H. (2014). Gadolinium Contrast Agents for CNS Imaging: Current Concepts and Clinical Evidence. *American Journal of Neuroradiology*, 35(12), 2215–2226. <https://doi.org/10.3174/ajnr.a3917>
5. Zhang, B., Liang, L., Chen, W., Liang, C., & Zhang, S. (2015). An Updated Study to Determine Association between Gadolinium-Based Contrast Agents and Nephrogenic Systemic Fibrosis. *PloS One*, 10(6), e0129720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129720>
6. Das, S., Mondal, S., & Ghosh, D. (2024). Carbon quantum dots in bioimaging and biomedicines. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1333752>
7. Rahmania, F. J., Huang, Y. S., Workie, Y. A., Imae, T., Kondo, A., Miki, Y., Imai, R., Nagai, T., Nakagawa, H., Kawai, N., & Tsutsumiuchi, K. (2023). Preparation of Functional Nanoparticles-Loaded Magnetic Carbon Nanohorn Nanocomposites towards Composite Treatment. *Nanomaterials*, 13(5), 839. <https://doi.org/10.3390/nano13050839>

8. Kanemaru, K., & Nakamura, Y. (2023). Activation Mechanisms and Diverse Functions of Mammalian Phospholipase C. *Biomolecules*, 13(6), 915. <https://doi.org/10.3390/biom13060915>
9. Aucar, M. G., & Cavasotto, C. N. (2020). Molecular Docking Using Quantum Mechanical-Based Methods. In *Methods in molecular biology* (pp. 269–284). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0282-9_17
10. Holderbach, S., Adam, L., Jayaram, B., Wade, R. C., & Mukherjee, G. (2020). RASPD+: Fast Protein-Ligand Binding Free Energy Prediction Using Simplified Physicochemical Features. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.601065>
11. Salmaso, V., & Moro, S. (2018). Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>
12. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
13. Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C., & Mainz, D. T. (2006). Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(21), 6177–6196. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>
14. Vilar, S., Cozza, G., & Moro, S. (2008). Medicinal Chemistry and the Molecular Operating Environment (MOE): Application of QSAR and Molecular Docking to Drug Discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8(18), 1555–1572. <https://doi.org/10.2174/156802608786786624>
15. Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. *Journal of Molecular Biology/Journal of Molecular Biology*, 267(3), 727–748. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>

16. Koes, D. R., Baumgartner, M. P., & Camacho, C. J. (2013). Lessons Learned in Empirical Scoring with smina from the CSAR 2011 Benchmarking Exercise. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(8), 1893–1904. <https://doi.org/10.1021/ci300604z>
17. Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
18. Singh, P., Pandit, S., Mokkapati, V., Garg, A., Ravikumar, V., & Mijakovic, I. (2018). Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1979. <https://doi.org/10.3390/ijms19071979>
19. Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020).

The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry

International Journal of Nanomedicine, Volume 15, 2555–2562. <https://doi.org/10.2147/ijn.s246764>
20. Madni, A., Noreen, S., Maqbool, I., Rehman, F., Batool, A., Kashif, P. M., Rehman, M., Tahir, N., & Khan, M. I. (2018). Graphene-based nanocomposites: synthesis and their theranostic applications. *Journal of Drug Targeting*, 26(10), 858–883. <https://doi.org/10.1080/1061186x.2018.1437920>
21. Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 25(16), 3731. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>
22. Xu, M., & Wang, L. V. (2006). Photoacoustic imaging in biomedicine. *Review of Scientific Instruments Online/Review of Scientific Instruments*, 77(4). <https://doi.org/10.1063/1.2195024>

23. Lucky, S. S., Soo, K. C., & Zhang, Y. (2015). Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chemical Reviews*, 115(4), 1990–2042. <https://doi.org/10.1021/cr5004198>
24. Khanna, P., Ong, C., Bay, B. H., & Baeg, G. H. (2015). Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. *Nanomaterials*, 5(3), 1163–1180. <https://doi.org/10.3390/nano5031163>
25. Wu, R., Peng, H., Zhu, J. J., Jiang, L. P., & Liu, J. (2020). Attaching DNA to Gold Nanoparticles With a Protein Corona. *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00121>
26. Conjeevaram, S. B., Blanchard, R. M., Kadaba, A., & Adjei, I. M. (2022). Vascular bifurcation influences the protein corona composition on nanoparticles and impacts their cellular uptake. *Nanoscale Advances*, 4(12), 2671–2681. <https://doi.org/10.1039/d2na00066k>
27. Delgado, A. F., Van Westen, D., Nilsson, M., Knutsson, L., Sundgren, P. C., Larsson, E. M., & Delgado, A. F. (2019). Diagnostic value of alternative techniques to gadolinium-based contrast agents in MR neuroimaging—a comprehensive overview. *Insights Into Imaging*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13244-019-0771-1>
28. Nakamura, Y., & Fukami, K. (2017). Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C. *Journal of Biochemistry/the Journal of Biochemistry*, mvw094. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw094>
29. Lyon, A. M., & Tesmer, J. J. G. (2013). Structural Insights into Phospholipase C- β Function. *Molecular Pharmacology*, 84(4), 488–500. <https://doi.org/10.1124/mol.113.087403>
30. Ubeysinghe, S., Wijayarathna, D., Kankanamge, D., & Karunarathne, A. (2023). Molecular regulation of PLC β signaling. In *Methods in enzymology on CD-ROM/Methods in enzymology* (pp. 17–52). <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2023.01.001>
31. Kim, Y. J., Guzman-Hernandez, M. L., Wisniewski, E., Echeverria, N., & Balla, T. (2016). Phosphatidylinositol and phosphatidic acid transport between the ER

- and plasma membrane during PLC activation requires the Nir2 protein. *Biochemical Society Transactions*, 44(1), 197–201. <https://doi.org/10.1042/bst20150187>
32. Oh-Hora, M., Yamashita, M., Hogan, P. G., Sharma, S., Lamperti, E., Chung, W., Prakriya, M., Feske, S., & Rao, A. (2008). Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nature Immunology*, 9(4), 432–443. <https://doi.org/10.1038/ni1574>
33. Somlyo, A. P., Walker, J. W., Goldman, Y. E., Trentham, D. R., Kobayashi, S., Kitazawa, T., & Somlyo, A. V. (1988). Inositol trisphosphate, calcium and muscle contraction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 320(1199), 399–414. <https://doi.org/10.1098/rstb.1988.0084>
34. Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer-aided Drug Design*, 7(2), 146–157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>
35. Kuznietsova, H., Géloën, A., Dziubenko, N., Zaderko, A., Alekseev, S., Lysenko, V., & Skryshevsky, V. (2023). In vitro and in vivo toxicity of carbon dots with different chemical compositions. *Discover Nano*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-023-03891-9>
36. Gaussian 16, Revision C.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; et al. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
37. Dobbs, K. D., & Hehre, W. J. (1987). Molecular orbital theory of the properties of inorganic and organometallic compounds. 6. Extended basis sets for second-row transition metals. *Journal of Computational Chemistry*, 8(6), 880–893. <https://doi.org/10.1002/jcc.540080615>
38. Bacskay, G. B. (1981a). A quadratically convergent Hartree—Fock (QC-SCF) method. Application to closed shell systems. *Chemical Physics*, 61(3), 385–404. [https://doi.org/10.1016/0301-0104\(81\)85156-7](https://doi.org/10.1016/0301-0104(81)85156-7)

39. Cao, X., & Dolg, M. (2002). Segmented contraction scheme for small-core lanthanide pseudopotential basis sets. *Journal of Molecular Structure. Theochem*, *581*(1–3), 139–147. [https://doi.org/10.1016/s0166-1280\(01\)00751-5](https://doi.org/10.1016/s0166-1280(01)00751-5)
40. Bacskay, G. B. (1981b). A quadratically convergent Hartree—Fock (QC-SCF) method. Application to closed shell systems. *Chemical Physics*, *61*(3), 385–404. [https://doi.org/10.1016/0301-0104\(81\)85156-7](https://doi.org/10.1016/0301-0104(81)85156-7)
41. Ögretir, C., & Csizmadia, I. G. (1991). Computational Advances in Organic Chemistry: Molecular Structure and Reactivity. In *Springer eBooks*. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-3262-6>
42. Citing UCSF Chimera. (n.d.). <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/docs/credits.html>
43. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, version 4.0, San Diego: Dassault Systèmes, 2015
44. Jezyk, M. R., Snyder, J. T., Gershberg, S., Worthylake, D. K., Harden, T. K., & Sondek, J. (2006). Crystal structure of Rac1 bound to its effector phospholipase C- β 2. *Nature Structural & Molecular Biology*, *13*(12), 1135–1140. <https://doi.org/10.1038/nsmb1175>
45. Snyder, J. T., Singer, A. U., Wing, M. R., Harden, T. K., & Sondek, J. (2003). The Pleckstrin Homology Domain of Phospholipase C- β 2 as an Effector Site for Rac. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, *278*(23), 21099–21104. <https://doi.org/10.1074/jbc.m301418200>
46. Weinstein, H., & Scarlata, S. (2011). The correlation between multidomain enzymes and multiple activation mechanisms— The case of phospholipase C β and its membrane interactions. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, *1808*(12), 2940–2947. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.08.028>

ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ

Додаток 1 - Результати молекулярного докінгу наночастинок у присутності та при виключенні субдиниці Gqa. Таблиця містить дані про найбільші афінності (ккал/моль) для наночастинок як з гадолінієм, так і без нього.

| Наночастинка | В присутності Gqa, найбільша афінність (ккал/моль) | При виключенні Gqa, найбільша афінність (ккал/моль) |
|--------------|--|---|
| A без Gd | -10.7 | -10.6 |
| A з Gd | -10.0 | -8.3 |
| B без Gd | -13.2 | -11.2 |
| B з Gd | -13.0 | -12.0 |
| C без Gd | -13.1 | -12.1 |
| C з Gd | -14.1 | -13.8 |
| D без Gd | -13.1 | -10.4 |
| D з Gd | -12.3 | -11.1 |