

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

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та
біоінформатики доцент Нипорко Олексій Юрійович
Протокол №____ засідання кафедри
від “____” _____ 2024 р.

**IN SILICO ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕХАНІЗМІВ
ВЗАЄМОДІЇ ГАДОЛІНІЙ – ОРГАНІЧНИХ НАНОКОМПОЗИТІВ ІЗ
МУСКАРИНОВИМИ ХОЛІНОРЕЦЕПТОРАМИ М3 ПІДТИПУ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента спеціальності 091 Біологія
Біоінформатика та структурна біологія
Фархутдінова Дмитра Руслановича

Науковий керівник
доцент кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
Войтешенко Іван Сергійович

Оцінка захисту роботи

ЗМІСТ

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	2
1.1 Структура сигналінгу та властивості мускаринових холінорецепторів	4
1.2 Гадоліній вмісні сполуки для МРТ, їх властивості	5
1.3 Вуглецеві точки, як нанокompозити широкого спектру біологічної активності.....	8
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ	11
2.1 Об'єкт дослідження	11
2.2 Підготовка до молекулярного докінгу.....	18
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	21
3.1 Дослідження молекулярних механізмів взаємодії гадоліній-органічних нанокompозитів з мускариновими холінорецепторами М3 підтипу.....	21
3.1.1 Результати взаємодії гадоліній-вмісних нанокompозитів з позаклітинною стороною білка	36
3.1.2 Результати взаємодії гадоліній-вмісних нанокompозитів з внутрішньоклітинною стороною білка	40
3.2 Дослідження молекулярних механізмів взаємодії нанокompозитів без гадолінію з мускариновими холінорецепторами М3 підтипу	44
3.2.1 Результати взаємодії нанокompозитів без гадолінію з позаклітинною стороною білка	58
3.2.2 Результати взаємодії нанокompозитів без гадолінію з внутрішньоклітинною стороною білка	61
ВИСНОВКИ.....	67
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	68

АНОТАЦІЯ

Фархутдінов Д.Р. In silico дослідження молекулярних механізмів взаємодії гадоліній-органічних нанокompозитів із мускариновими холінорецепторами М3 підтипу – випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біологія (біоінформатика та структурна біологія).

За допомогою методу молекулярного докінгу у цій роботі було проведено дослідження взаємодії гадоліній вмісних та без гадолінієвих оптимізованих вуглецевих точок з білком структури мускаринового холінорецептора М3. Знайдено найкращу частинку ВА (відсутній гадоліній) яка має афінність -10,9 ккал/моль. Також знайдено найкращу гадоліній вмісну частинку TAGd, яка має афінність -10,3 ккал/моль.

Отримані результати, можуть бути в подальшому використані для вивчення інших підходів до створення контрастних речовин МРТ

Ключові слова: Гадоліній, молекулярний докінг, вуглецеві точки, афінність, МРТ.

ВСТУП

У сучасній біомедицині та фармакології інтерес до дослідження взаємодії різних молекулярних компонентів з рецепторами людського організму є надзвичайно великим. Мускаринові холінорецептори М3 підтипу відіграють ключову роль у регуляції багатьох фізіологічних процесів, включаючи контроль над гладкою мускулатурою та секрецією залоз. Тому дослідження механізмів їх взаємодії з різноманітними агентами є важливим для розробки нових лікарських засобів та терапевтичних підходів.

Останніми роками значну увагу привернули інноваційні підходи до вивчення таких взаємодій, зокрема методи *in silico*. Ці методи дозволяють здійснювати молекулярне моделювання та симуляцію взаємодій на атомному рівні, що значно знижує витрати на експериментальні дослідження та прискорює процес отримання нових знань.

Гадоліній, відомий своїми унікальними магнітними властивостями, широко використовується як контрастний агент у магнітно-резонансній томографії (МРТ). Його здатність підвищувати контрастність зображень робить його надзвичайно корисним для діагностики різноманітних захворювань. У зв'язку з цим, гадоліній-органічні наноконpozити виявилися перспективними кандидатами не лише для діагностики, але й для терапевтичного застосування завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям.

Дана дипломна робота має мету з'ясування молекулярних механізмів взаємодії гадоліній-органічних наноконpozитів з біологічними мішенями, такими як мускаринові холінорецептори М3 підтипу. Використання методів *in silico* для таких досліджень дозволяє не лише детально зрозуміти ці механізми, але й передбачити можливі ефекти наноконpozитів у живому організмі.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Структура сигналіngu та властивості мускаринових холінорецепторів

Мускаринові рецептори (mAChRs) є типовими представниками сімейства рецепторів, пов'язаних з білком G (GPCR) та існують у п'яти варіантах, від M1 до M5.

Структура сигналіngu мускаринових ацетилхолінових рецепторів (mAChR) є доволі специфічною структурою. Деякі відповіді mAChR відбуваються завдяки вивільненню оксиду азоту, включаючи секрецію слинних залоз і повільну хвилеву активність гіпокампа. mAChR використовують різні внутрішньоклітинні шляхи для активації різних мітоген-активованих протеїнкіназ. Кінази беруть участь у холінергічній регуляції функціях епітелію нирок, а також катаболізмі білка-попередника амілоїду. Активація mAChR також може стимулювати або пригнічувати клітинний ріст і апоптоз залежно від попередніх рівнів клітинної активності. Після активації класичними або алостеричними агоністами mAChR можуть бути фосфорильовані різними рецепторними кіназами та кіназами, що регулюються вторинними месенджерами. Фосфорильовані підтипи mAChR можуть взаємодіяти з бета-арестином і, ймовірно, також з іншими адапторними білками. У результаті різні сигнальні шляхи mAChR можуть бути змінені по-різному, що призводить до короткочасної або тривалої десенсибілізації певного сигнального шляху, опосередкованої рецептором активації мітоген-активованого протеїнкіназного шляху після фосфорильовання mAChR, а також тривале потенціювання mAChR-опосередкованої стимуляції фосфоліпази C [1, 2].

Дані рецептори mAChR, а саме підтип M3 включає в себе багато важливих фізіологічних функцій, таких як скорочення гладкої мускулатури та секрецію залоз. Важливо зауважити що підтип M3 mAChR експресується на відносно високих рівнях у гіпоталамусі, але також виявляється в багатьох інших областях мозку [12]. Центральні рецептори M3 також беруть участь у регуляції споживання їжі, навчання та пам'яті, а також правильного розвитку передньої частки гіпофіза. Селективні препарати, націлені на цей підтип рецепторів, та можуть виявитися клінічно корисними, а неселективні мускаринові ліганди вже широко використовуються в сучасній практиці [11].

1.2 Гадоліній вмісні сполуки для МРТ, їх властивості

Гадоліній - це металічний елемент з атомним номером 64 у періодичній системі елементів. Його іони, використовуються в медицині як контрастні агенти для підвищення яскравості зображень при проведенні магнітно-резонансної томографії (МРТ) [3].

Контраст зображення (Рис.1) визначається різницею в яскравості між областями дослідження та оточенням. Чим більша ця різниця, тим легше розрізнити різні типи тканин на зображенні.

Концентрація контрастного агенту на основі гадолінію в певній тканині залежить від кількох факторів, включаючи фармакокінетику агенту, його структуру та заряд, силу магнітного поля, середовище тканини та архітектуру органів. *In vitro* вважається, що концентрація контрасту в тканині теоретично лінійно залежить від його релаксивності (R). Проте в живому організмі цей процес обмежується додатковими ефектами релаксації [4,5].

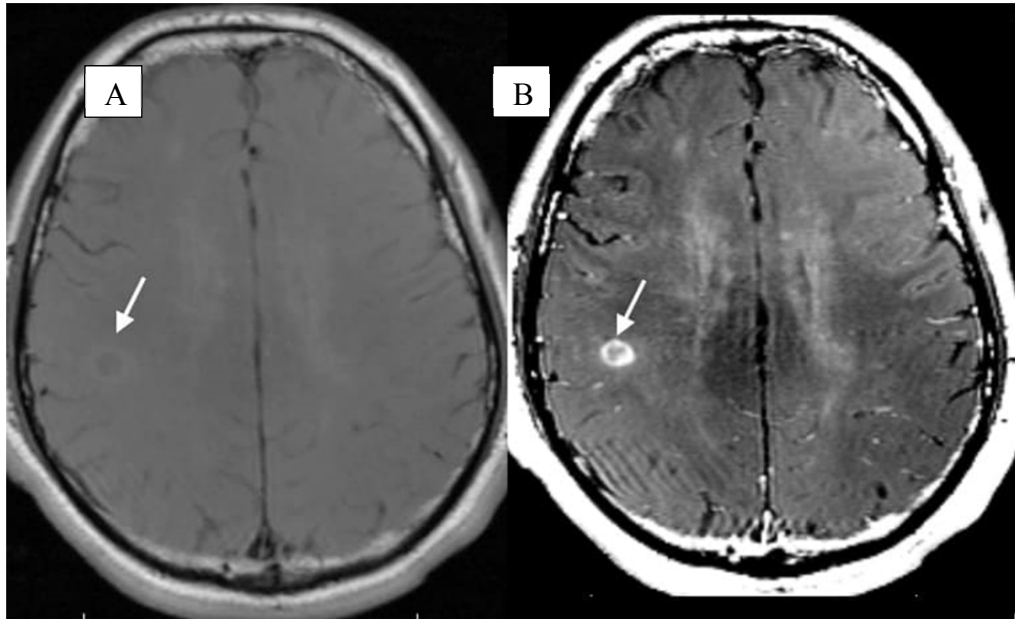


Рис.1 Зображення МРТ без контрастного агента гадолінію (А) та з контрастним агентом гадолінію (В)

Гадолінієві контрастні агенти для МРТ можуть бути розділені на кілька категорій в залежності від їх використання та властивостей.

Найчастіше використовуються позаклітинні агенти. Вони являють собою лінійні або макроциклічні хелати, доступні у вигляді іонних або неіонних препаратів. Лінійні хелати — це гнучкі відкриті ланцюги, які не забезпечують міцного зв'язування з Gd^{3+} . Навпаки, макроциклічні хелати забезпечують міцне зв'язування з Gd^{3+} завдяки попередньо організованим жорстким кільцям майже оптимального розміру для закріплення атома гадолінію. Неіонні препарати також менш стабільні порівняно з іонними, оскільки зв'язування Gd^{3+} з негативно зарядженими карбоксильними групами сильніше порівняно з амідами або спиртом у неіонних препаратах. В загальному позаклітинні агенти використовуються для візуалізації пухлин і запалень, а також у магнітно-резонансній ангіографії (МРА). Їх також можна використовувати як внутрішньосуглобові засоби при магнітно-резонансній артрографії (МРА) [6,7].

Агенти пулу крові: ці агенти використовуються майже виключно в магнітно-резонансній ангіографії. Хоча вищезазначені позаклітинні агенти

зазвичай використовуються, синхронізація зображення повинна бути точною, щоб зафіксувати перше проходження цих агентів в артеріальній системі. З іншого боку, контрастні речовини для пулу крові мають довший внутрішньосудинний період напіврозпаду, що дозволяє подовжити час візуалізації далеко за межі короткої артеріальної фази першого проходження. Ці агенти далі поділяються на високомолекулярні та низькомолекулярні. Високомолекулярні агенти в даний час не використовуються в клінічній практиці. Найважливішим із низькомолекулярних препаратів є Гадофосвесет тринатрію (Аблавар, раніше Васовіст), мономер, який нековалентно зв'язується з альбуміном у плазмі крові людини, що робить його агентом кровотворення [8].

Гепатобіліарні препарати гадолінію використовуються для покращення візуалізації структур гепатобіліарної системи, зокрема печінки та жовчних шляхів. Ці препарати мають особливості, які роблять їх корисними для вивчення патологій цих органів.

Гадобенат димеглюміну (Gd-BOPTA, MultiHance) має ліпофільну частину, яка дозволяє поглинати через синусоїдальну та каналцеву сторону гепатоцитів. Його поглинання печінкою становить менше 5% введеної дози, що можна виділити на відстрочених зображеннях, коли внутрішньосудинний компонент в основному виводиться нирками. Тому в перші кілька хвилин після введення Gd-BOPTA діє як звичайний позаклітинний агент; однак спостерігається помітне та тривале посилення нормальної паренхіми печінки через 40–120 хвилин після введення, у цей момент вогнищеві ураження печінки виділятимуться як темні ураження на відміну від покращення нормальної печінки. Очевидним недоліком є необхідність чекати 40 хвилин, щоб отримати діагностичні зображення.

Гадоксетова кислота (Gd-EOB-DTPA, Eovist, Primovist) має схожі властивості з гадобенатом димеглюміну, але додатково включає в себе органічну молекулу, яка забезпечує йому здатність зв'язуватися з

рецепторами на гепатоцитах. Це дозволяє отримати зображення, які відрізняють патологічні ураження від нормальної тканини печінки, що може бути корисним для діагностики пухлин та інших уражень.

Гепатобіліарні препарати гадолінію є важливими для діагностики та моніторингу патологій печінки та жовчних шляхів. Вони дозволяють отримати детальні та інформативні зображення цих органів, що допомагає лікарям у постановці діагнозу та виборі оптимального методу лікування [9,10].

1.3 Вуглецеві точки, як нанокompозити широкого спектру біологічної активності

Вуглецеві точки (CD) — це новий тип наночастинок на основі вуглецю з унікальними характеристиками. Вони представляють собою майже сферичні наноматеріали з розміром частинок менше 10 нм. [13] Використовуючи світлову енергію, ці матеріали здатні вбивати найближчі патогени за рахунок виробництва активних форм кисню (АФК). Ці матеріали часто імітують морфологію та функції природних ферментів. Також вони є нульвимірними сферичними алотропами та демонструють кілька цікавих властивостей, таких як розчинність у воді, екологічність, провідність, оптичні властивості, низька токсичність, біосумісність і тераностичність [14].

Дослідження вуглецевих точок з збагаченими гідроксильованими вуглеводневими ланцюгами та метиленовими групами (CD_GE), карбоксильними та фенольними групами, що супроводжуються азотом (CD_3011), трифторметилом (CDF19) та групами толуїдину та аніліну (CDN19), показали такі результати що, лише у збагачених кисневмісними та азотовмісними функціональними групами, можуть бути токсичними після багаторазового введення [13].

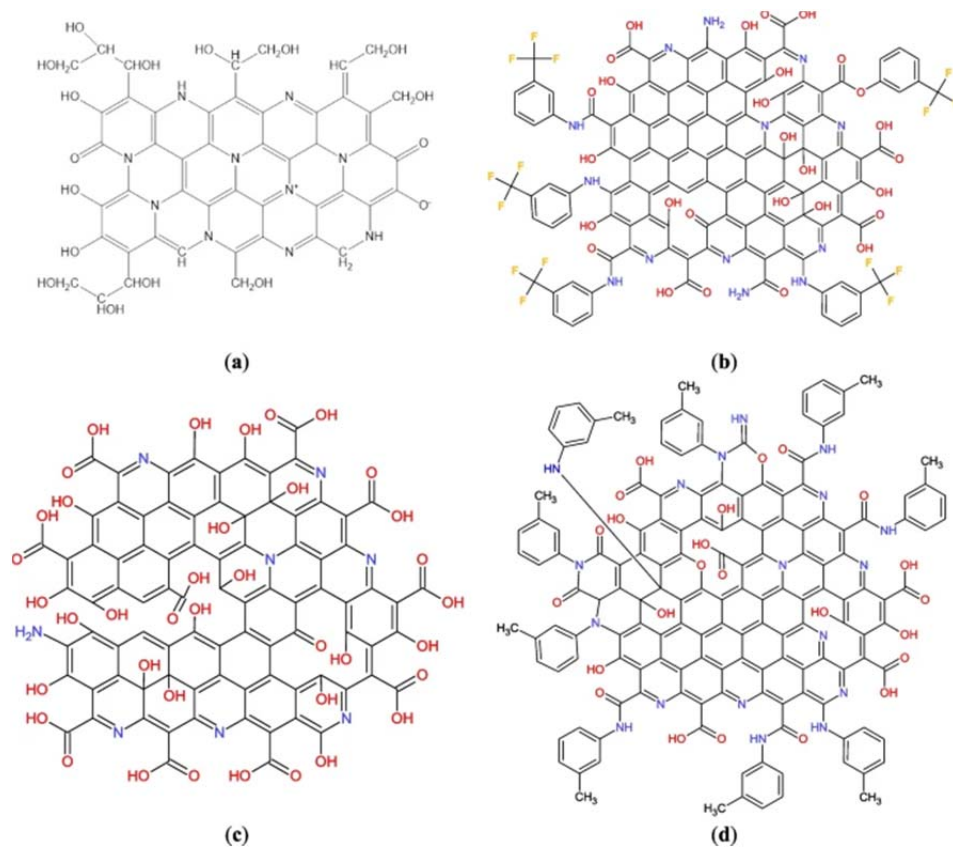


Рис.2 Запропоновані структури зразків
CD_GE (a), CDF19 (b), CD_3011 (c) і CDN19 (d)

Вуглецеві наночастинки володіють ексклюзивними спектроскопічними властивостями, їх торці та бічні стінки можна легко функціоналізувати ковалентно або нековалентно, і вони можуть бути виготовлені з біоактивними пептидами, низькомолекулярними ліками, білками або нуклеїновими кислотами. Такі агенти можна легко з'єднати з нанотрубкою через зв'язок, що розривається. Також ці частинки мають потенціал для проникнення в клітини, це покращує поглинання терапевтичних агентів і захищає їх під час транспортування та проникнення [15,16].

Зазвичай низькі концентрації розчинів вуглецевих наночастинок не є значно токсичними для клітин людини, а в деяких випадках можуть навіть

сприяти росту клітин. Однак їх цитотоксичність має тенденцію до значного збільшення, коли їх концентрація підвищується до певного рівня, і як такі мають високу біосумісність і нижчу цитотоксичність порівняно з традиційними напівпровідниковими квантовими точками. Здатність флуоресцентного випромінювання вуглецевих квантових точок робить їх цінними як флуоресцентні зонди для виявлення та аналітичних цілей. Отже, вуглецеві точки, що володіють багатьма властивостями, можуть бути ефективно використані для візуалізації всередині організмів, а також для транспортування ліків [17,18].

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Мета дослідження : дослідження взаємодії гадоліній-вмісних та без гадолінієвих частинок на мускаринові холінорецептори М3.

Для досягнення мети потрібно виконати наступні завдання:

1. Отримання білка з Protein Data Bank структури мускаринового холінорецептора М3 підтипу;
2. Підготовка білка до молекулярного докінгу;
3. Квантово-механічна оптимізація лігандів;
4. Проведення молекулярного докінгу з позаклітинної та внутрішньоклітинної сторони білка.

2.1 Об'єкт дослідження

Білок структури мускаринового холінорецептора М3 (mAChR М3) отримано з [31], код 4DAJ організм *Rattus norvegicus*.

Таблиця 2.1 Характеристики білка 4DAJ

Кількість атомів	13589
Змодельована кількість залишків	1721
Кількість віддалених залишків	1916
Унікальні білкові ланцюги	1

Рецептор М3 є одним із п'яти підтипів мускаринових рецепторів, які належать до родини G-білок зв'язаних рецепторів (GPCR). Структура М3 була визначена за допомогою рентгенівської кристалографії і включає білок-ліганд комплекс, де білок активується ацетилхоліном або його агоністами. Структура М3 показує типову для GPCR конформацію, яка включає сім трансмембранних спіралей (див. Рис.1).

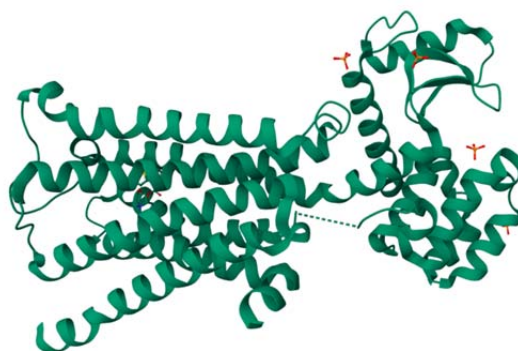


Рис. 2.1 Об'єкт дослідження, білок – 4DAJ

Наступний крок, оцінення якості білка на сервері MolProbity [27].

На карті Рамачандрана з лізоцимом структура 4DAJ має наступні показники: залишки в бажаних областях – 92,0% (1568/1705), залишки в дозволених областях – 99,9% (1704/1705), також відмічено 1 outliers (phi,psi) 1094 Val (-56.4 , -71.0).

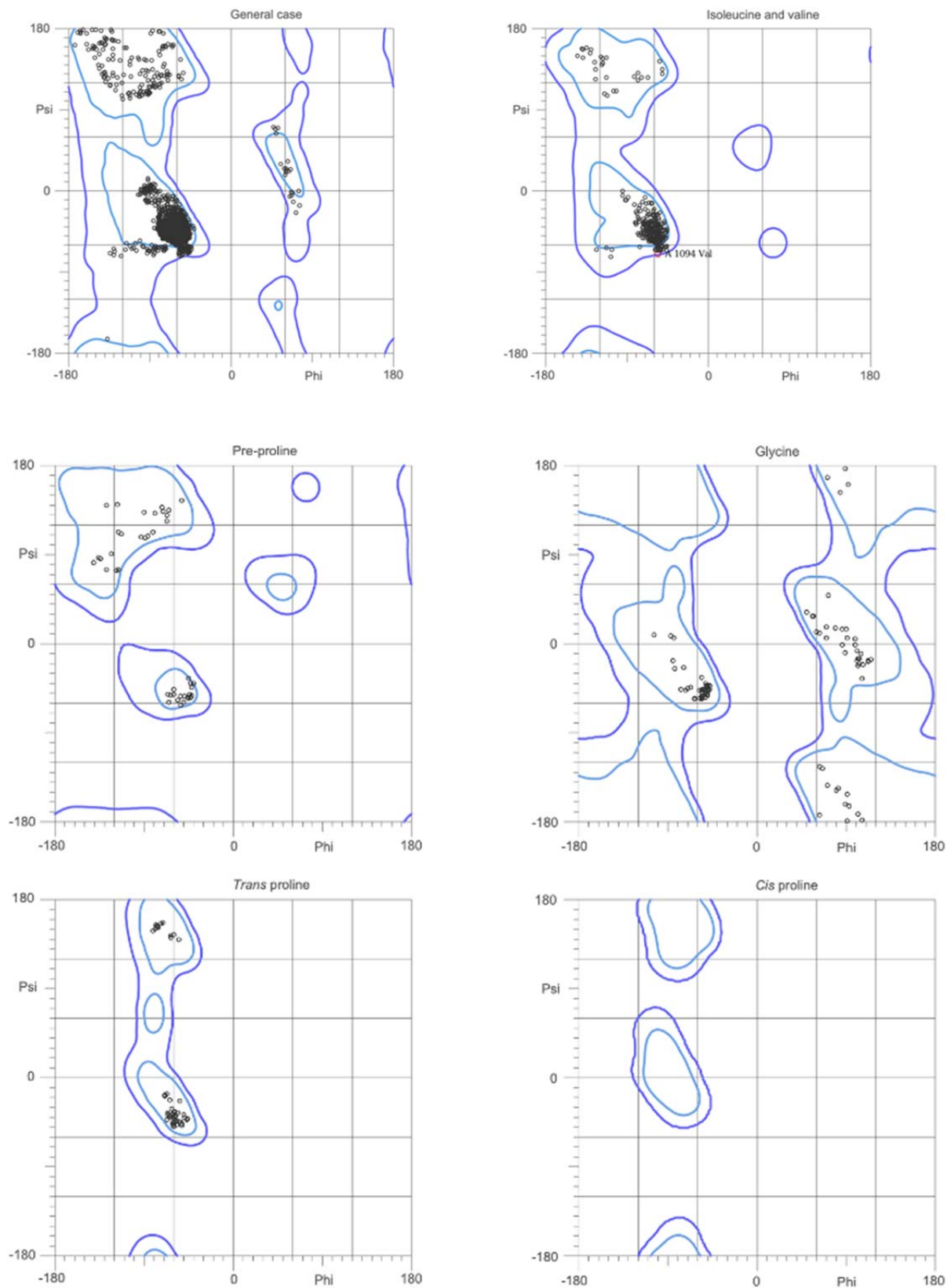


Рис. 2.2 Карта Рамачандрана з лізоцимом

На карті Рамачандрана без лізоциму структура 4DAJ має наступні показники: залишки в бажаних областях – 98,0% (238/260), залишки в дозволених областях – 99,8% (260/260), важливо наголосити що відсутній outliers.

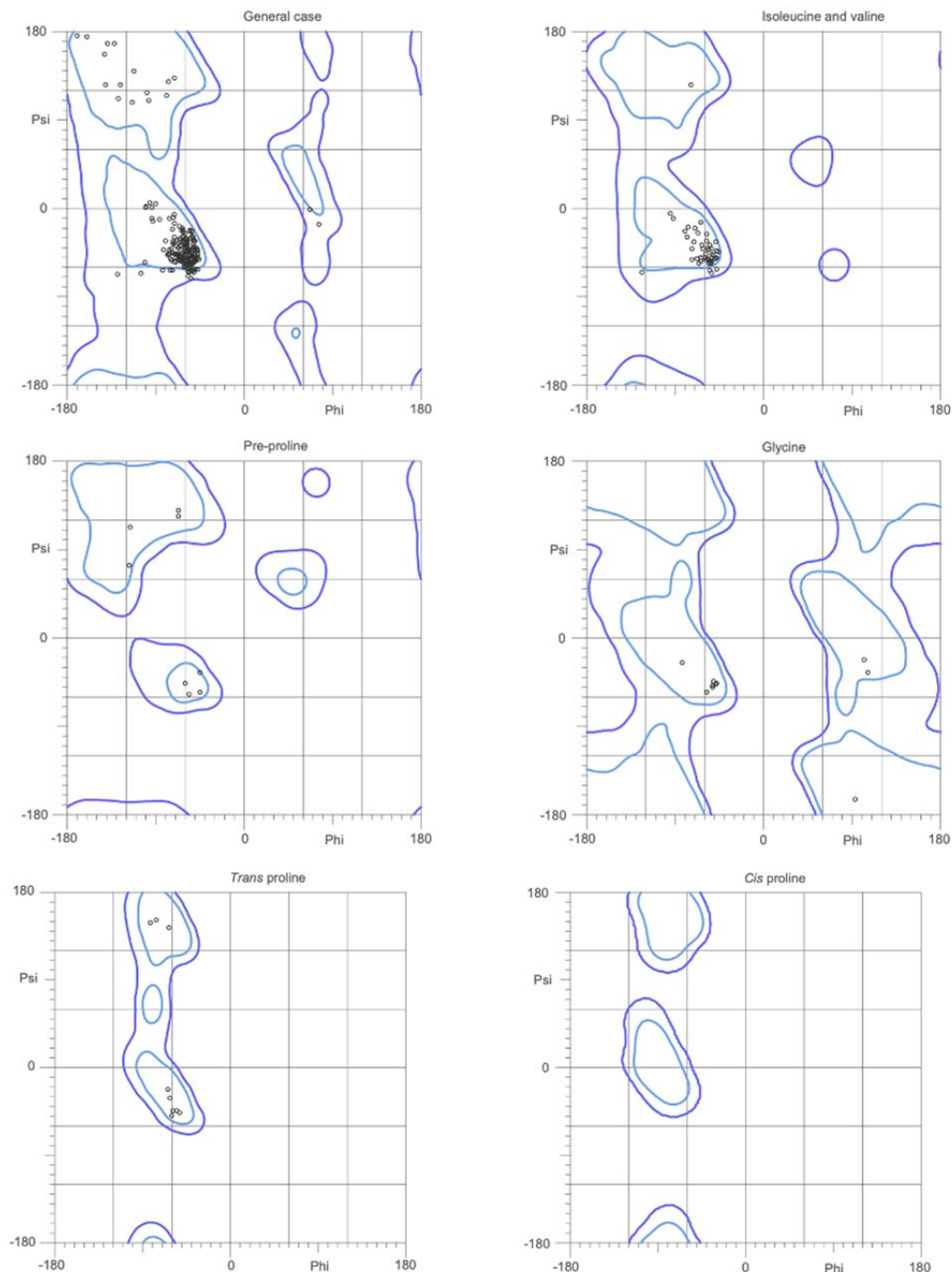


Рис. 2.3 Карта Рамачандрана без лізоциму

Частину білка було видалено, оскільки вона була штучно модифікована і не відповідала амінокислотній послідовності. До того ж із порівняння на Карті Рамачандрана можна побачити outliers Val1094, який свідчить про можливі помилки в моделі білка. Val1094 входять до складу амінокислотної послідовності частинки лізоциму (Рис. 2.2).

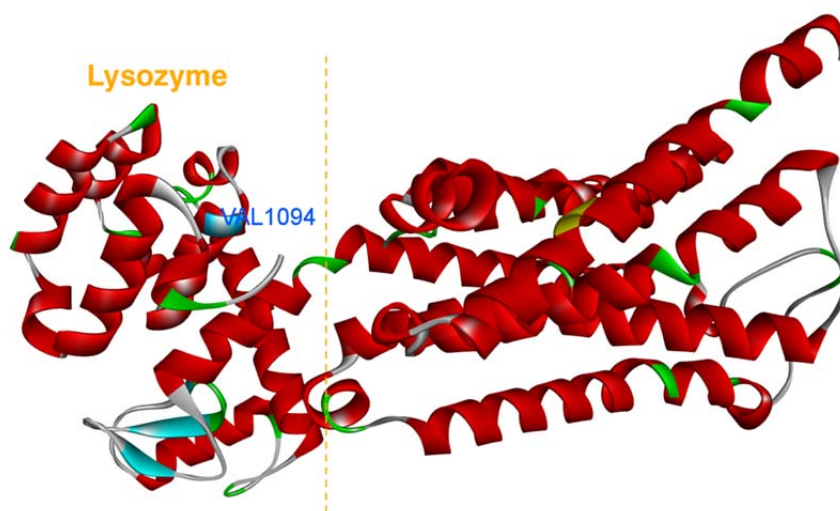
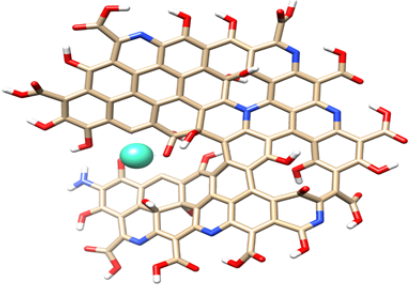
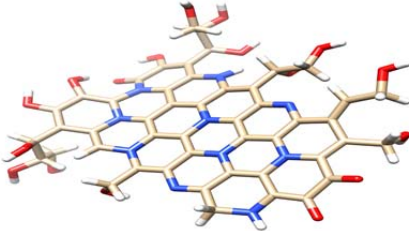
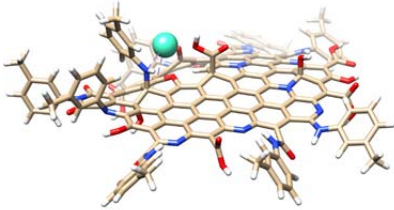
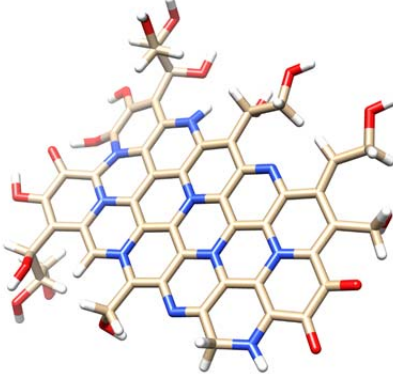
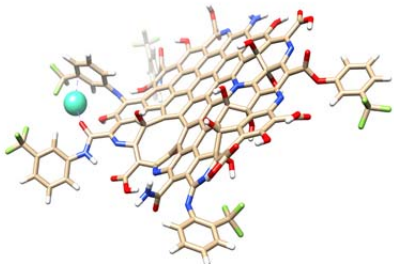
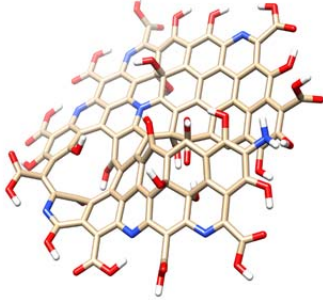


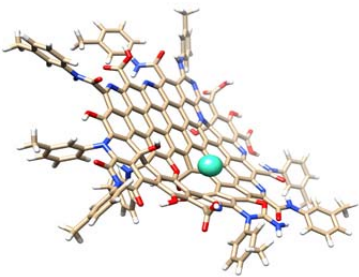
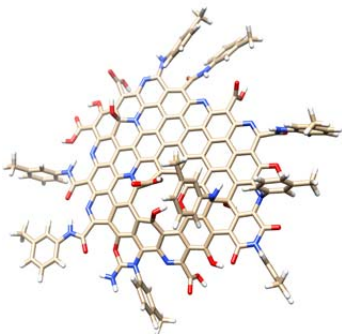
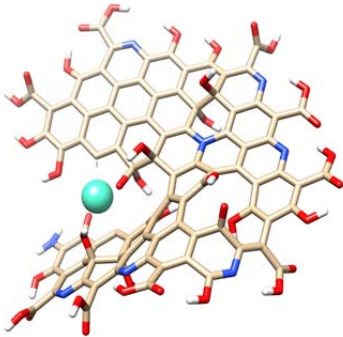
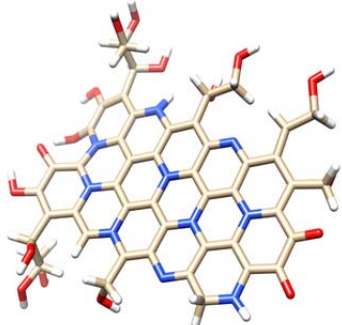
Рис. 2.4 Білок 4DAJ з позначенням Val1094 в складі лізоциму, пунктирна лінія – вектор розрізу білка.

Частинки для молекулярного докінгу отримані з синтезу карбонових точок, а саме збагаченими гідроксильованими вуглеводневими ланцюгами та метиленовими групами (CD_GE), карбоксильними та фенольними групами, що супроводжуються азотом (CD_3011), трифторметилом (CDF19) або групами толуїдину та аніліну (CDN19).

Гадоліній розміщено авторським способом з метою максимального охоплення всеможливих варіантів внутрішньомолекулярних взаємодій: між наночастинками, у функціональних групах наночастинки, біля площини наночастинки, біля кисневих груп на площині наночастинки, наведені нижче в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 Оптимізовані структури вуглецевих точок з гадолінієм та без гадолінію

CAGd	CA
	
DAGd	DA
	
BAGd	BA
	

GAGd	GA
	
TAGd	TA
	

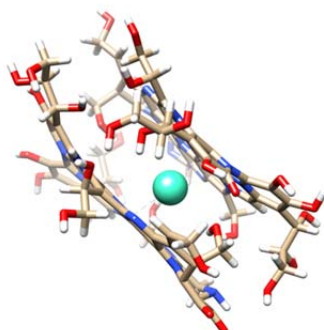


Рис. 2.5 Оптимізована структура 2AGd вуглецевих точок з положенням гадолінія між ними

Також ми провели оптимізацію сполуки 2AGd з розташуванням гадолінія між двома вуглецевими точками (Рис 2.5).

2.2 Підготовка до молекулярного докінгу

Докінг проведено сліпим, жорстким докінгом за допомогою Smina osx.12, що є розширеною версією Vina AutoDock 1.1.2 для широкого класу металів. Так, будь-який важкий метал моделюється усередненими фізичними параметрами:

Таблиця 2.2 Усереднені фізичні параметри для важких металів

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_acceptr	0
Ad_heteroatom	1

Власне параметри докінгу були використані за замовчуванням з такими значеннями:

- $\text{electrostatic}(i=2, \wedge=100, c=8)$ - i — показник відстані, c — межа відстані;
- $\text{ad4_solvation}(d\text{-sigma}=3.6, s/q=0.01097, c=8)$ - десольватація, q визначає, чи значення залежить від заряду в усіх термінах;
- $\text{gauss}(o=0, w=0.5, c=8)$, o – зсув, w – ширина гауса;
- $\text{repulsion}(o=0, c=8)$, o зсув квадрата відстані відштовхування;

- hydrophobic(g=0.5,_b=1.5,_c=8), g хороша відстань, b – гірша;
- non_hydrophobic(g=0.5,_b=1.5,_c=8), значення лінійно інтерполюється між g і b;
- vdw(i=6,_j=12,_s=1,_^=100,_c=8), i та j — показники LJ s — згладжування, ^ — верхня межа;
- non_dir_h_bond_lj(o=-0.7,_^=100,_c=8), потенціал LJ 10-12, обмежений ^;
- non_dir_anti_h_bond_quadratic(o=0,_c=8);
- non_dir_h_bond(g=-0.7,_b=0,_c=8), g – хороша, b – погана;
- acceptor_acceptor_quadratic(o=0,_c=8), квадратичний потенціал між акцепторами водневого зв'язку;
- donor_donor_quadratic(o=0,_c=8), квадратичний потенціал між донорами водневих зв'язків;
- atom_type_gaussian(t1=,t2=,o=0,_w=0,_c=8), потенціал Гауса між зазначеними типами атомів;
- atom_type_linear(t1=,t2=,g=0,_b=0,_c=8), лінійний потенціал між визначеними типами атомів;
- atom_type_quadratic(t1=,t2=,o=0,_c=8), квадратичний потенціал між визначеними типами атомів;
- atom_type_inverse_power(t1=,t2=,i=0,_^=100,_c=8) зворотний потенціал потужності між визначеними типами атомів.

Бокс визначався на всю поверхню амінокислот з внутрішньоклітинного та позаклітинного боку відповідно :

Для позаклітинного боку: center_x 11.7412 --center_y 16.6515 --center_z -45.5607 --size_x 42.5846 --size_y 35.1639 --size_z 15.6614

Для внутрішньоклітинного боку: --center_x 24.9971 --center_y 3.83524 --center_z 4.47696 --size_x 103.696 --size_y 42.1199 --size_z 65.0217

Бокс робили з допомогою UCSF Chimera. [19] Візуалізація мембрани

виконана в програмі ChemCraft [20] авторським способом. Площин мембрани наведена на рисунку 2.2 отримані відповідно до алгоритму [28].

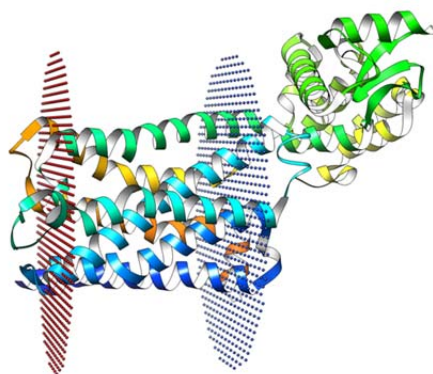


Рис. 2.2 Мембрана навколо білка 4DAJ

Решта візуалізацій реалізовано у Discovery Studio з параметрами ідентифікації зв'язків по замовчуванню. Квантово-механічні обчислення в даній роботі виконувались за допомогою програмного забезпечення Gaussian G16 [21]. Оптимізована геометрія структур була обчислена з використанням двома підходами: методом Гартрі-Фока [22] з мінімальним базисом з поляризаційною функцією hf/3-21+g [23], 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 $Z > 2$ [24], XQC – чисельна квадратично збіжна процедура [25] для SCF [26], opt=Loose пом'якшені критерії збіжності на покращеній сітці інтегрування відповідно int=(grid=ultrafine).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Дослідження молекулярних механізмів взаємодії гадоліній-органічних нанокompatитів з мускариновими холінорецепторами М3 підтипу

Метою наступного етапу є обчислювальний експеримент молекулярних механізмів взаємодії гадоліній-органічних нанокompatитів та безгадолінієвих нанокompatитів. Новий підхід у розвитку сфери наукових експериментів акцентує на зменшенні використання лабораторних тварин шляхом впровадження методів *in silico*, які можуть слугувати рівноцінними альтернативами. Особливу увагу приділяється підтвердженню цих методів для забезпечення точності результатів, що раніше отримували за допомогою дослідів на тваринах. Наприклад, використання молекулярного докінгу для дослідження мускаринових холінорецепторів М3 показує високий рівень кореляції з біологічними експериментами, досягаючи від 75 до 85% збігу результатів.

Першою сполукою, є частинка CAGd яка знаходиться на позаклітинній частині (див. Рис.3.1).

З огляду на 2Д діаграму, можна побачити, що частинка має 4 водневих зв'язки ARG176, LYS99, GLN97, ARG176. Найкраща скорингова функція першої частинки: -8,8 ккал/моль, що свідчить про сильну енергію зв'язування в порівнянні з 9 чи 10 варіантом. Наявність Pi-Alkyl (LYS96) є однієї гідрофобною взаємодією у сполуці.

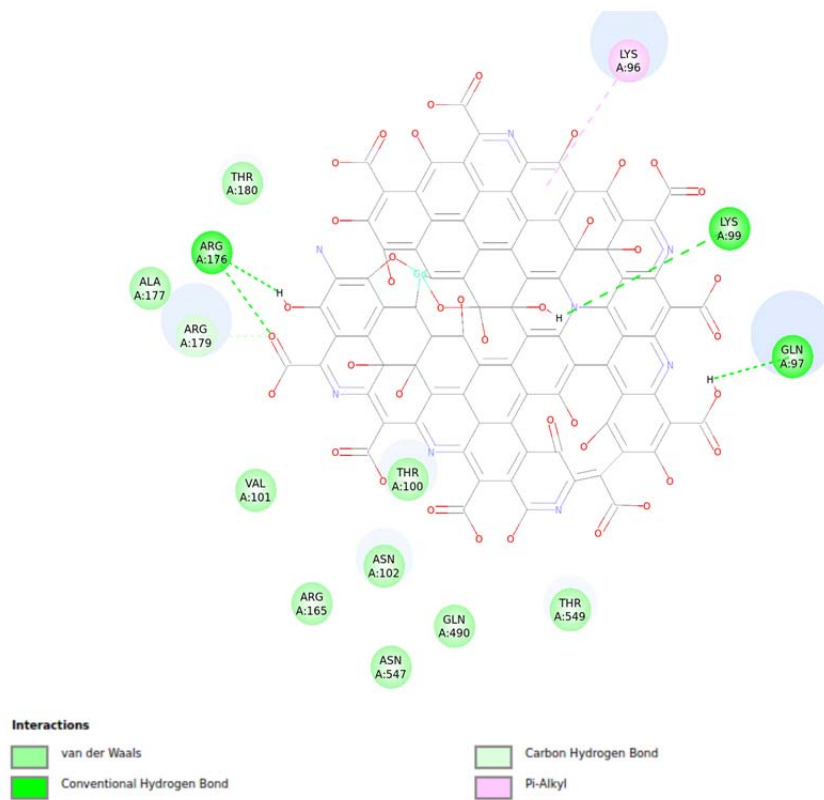


Рис. 3.1 - 2Д діаграма взаємодії між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору M3 та лігандом CAGd, візуалізовано – Discovery Studio (тут і далі)

Таблиця 3.1 Енергія зв'язування, дистанція від середнього квадратичного відхилення початкової позиції, найкраща позиція середнього квадратичного відхилення від початкової позиції (тут і далі – результати проведеного докінгу) між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору M3 з кодом 4DAJ та лігандом CAGd, визначено програмою SMINA (тут і далі)

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-8.8	0.000	0.000
2	-8.7	11.221	18.801
3	-8.6	13.001	18.253
4	-8.6	18.373	25.844
5	-8.7	12.745	20.003
6	-8.3	19.089	26.632
7	-8.1	21.278	28.481
8	-7.8	20.960	26.223

9	-7.3	21.431	29.132
10	-7.3	20.635	28.124

Далі проаналізуємо з внутрішньоклітинного боку частинку CAGd (див. Рис.3.2). На 2Д діаграмі можна звернути увагу що утворюються чотири водневих зв'язки, а також утворюється так званий unfavorable bintp (який позначений червоним кольором). Іншими словами ця несприятлива взаємодія, але вона не обов'язково може вказувати на те, що частинка не є хорошим інгібітором, тому що гнучкість білка не враховується в програмі SMINA. Тому сполука може підходити через модель індукованої відповідності або сполука може мати неочікуваний спосіб дії або інше місце зв'язування. Порівнюючи обидві структури можна зробити висновок, що краща афінність частинки CAGd з внутрішньоклітинного боку.

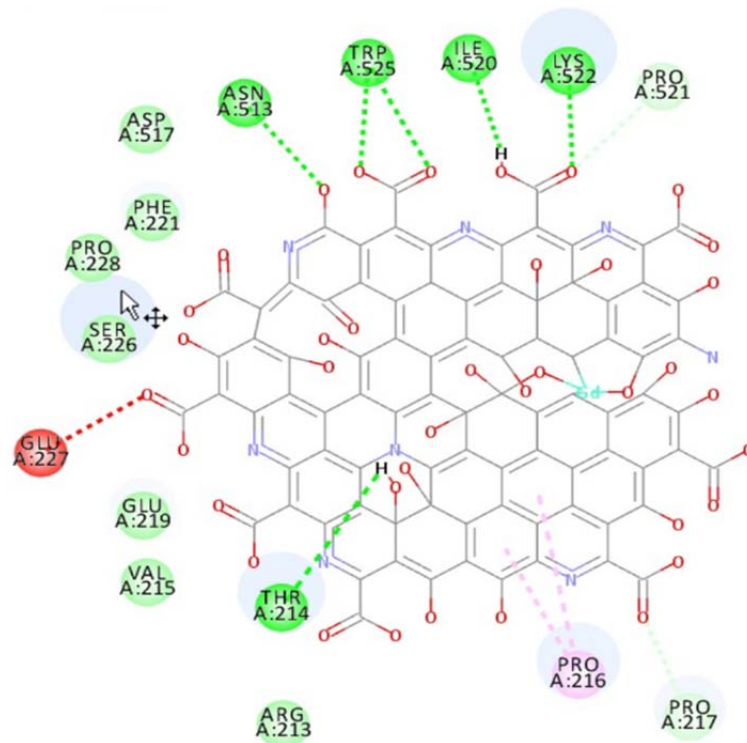


Рис. 3.2 2Д діаграма взаємодії між внутрішньоклітинною

стороною білка структури мускаринового холінорецептору M3 з кодом 4DAJ та лігандом CAGd.

Таблиця 3.2 Результати проведеного докінгу між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору M3 та лігандом CAGd.

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-10.7	0.000	0.000
2	-10.6	14.679	19.618
3	-10.5	22.602	27.059
4	-10.2	4.331	13.799
5	-9.9	2.067	10.603
6	-9.8	19.680	25.376
7	-9.8	33.192	38.228
8	-9.3	2.705	10.734
9	-9.3	4.242	13.235
10	-9.2	18.026	22.035

Охарактеризуємо наступну частинку DAGd (див.Рис.3.3). Зауважимо, що майже відсутні водневі зв'язки, афінність : -4,0 ккал/моль, також утворилось лише 4 варіанти частинок після докінгу, це пояснюється невеликою кількістю амінокислотних залишків на площі. Також утворено 8 гідрофобних взаємодій Pi-Alkyl це може свідчити про те, що ліганд має гідрофобні залишки, які взаємодіють з гідрофобними ділянками білка.

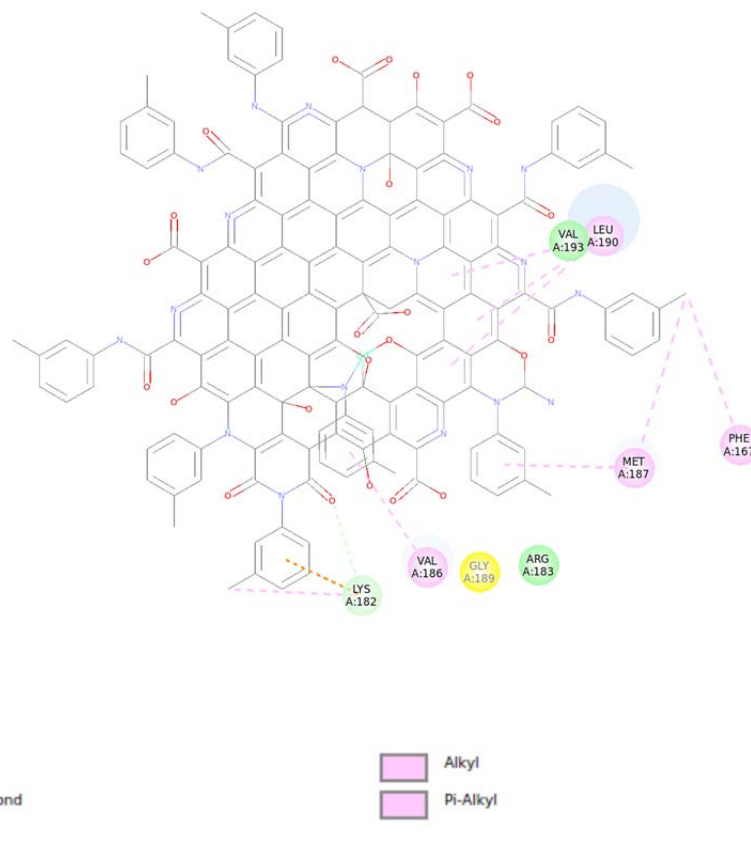


Рис. 3.3 2Д діаграма взаємодії між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом DAGd.

Таблиця 3.3 Результати проведеного докінгу між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом DAGd

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-4.0	0.000	0.000
2	-3.8	12.959	24.218
3	-3.4	4.059	13.724
4	-2.0	1.032	1.416

Перейдемо до частинки DAGd на внутрішньоклітинній стороні (див. Рис.3.4) і порівняємо відмінності. Скорингова функція молекули: -9,4 ккал/моль, оскільки всі інші частинки з більшою енергією зв'язку заходили на мембранні амінокислоти, а отже вони нам не підходять. GLU219 виступає в ролі Pi-anion, тому що він взаємодіє в ароматичних кільцях в пі-аніонних взаємодіях. Кажучи детальніше Пі-аніонна взаємодія відбувається між негативно зарядженим атомом або групою та ароматичним кільцем. PRO216 та ARG213 утворюються гідрофобні взаємодії. Порівнюючи з позаклітинною стороною відмінність велика, враховуючи більшу кількість амінокислотних залишків на поверхні для докінгу та відповідно більше варіантів енергії зв'язування одного ліганда.

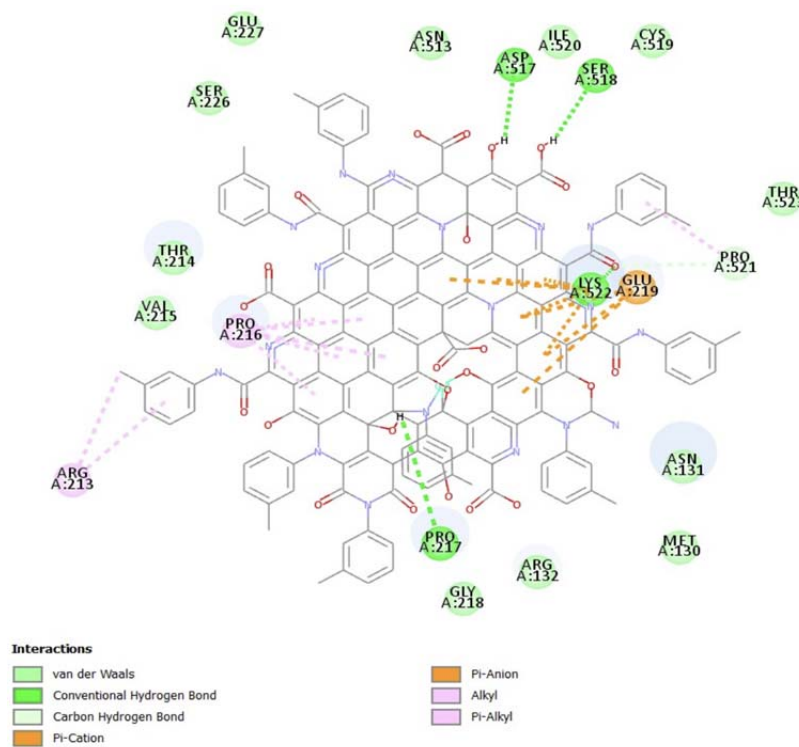


Рис. 3.4 2Д діаграма взаємодії між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору та лігандом DAGd.

Таблиця 3.4 Результати проведеного докінгу між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору M3 та лігандом DAGd

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-10.1	0.000	0.000
2	-9.8	2.339	17.285
3	-9.7	36.354	44.248
4	-9.7	35.870	42.122
5	-9.4	36.198	43.807
6	-9.4	17.617	25.571
7	-9.2	37.473	43.026
8	-9.0	37.936	43.418
9	-9.0	2.301	4.386
10	-8.8	35.810	42.031

Наступна частинка з позаклітинної сторони BAGd (див. Рис.3.5). Враховуючи найкращу скорингову функцію -5,5 ккал/моль, можна зрозуміти що енергія зв'язування у частинки мала, більше того велика перевага гідрофобних взаємодій, а саме 12 зв'язків, в той час як водневий зв'язок утворюють лише ARG183 та THR180. Також потрібно звернути увагу на TYR175 який утворює Pi-Pi Stacked в гетероароматичному кільці. Pi-Pi Stacked тирозин вказує на взаємодію ароматичних кілець тирозину через pi-електронні області. Тирозин містить фенольне кільце, яке може брати участь у pi-стиканні з іншими ароматичними кільцями. Враховуючи всі вище наведені факти, можемо стверджувати що частинка знаходиться в гідрофобній області, за це відповідають наступні амінокислоти: VAL186, VAL193, LEU190, MET187, PHE167 або біля зв'язувальної гідрофобної кишені.

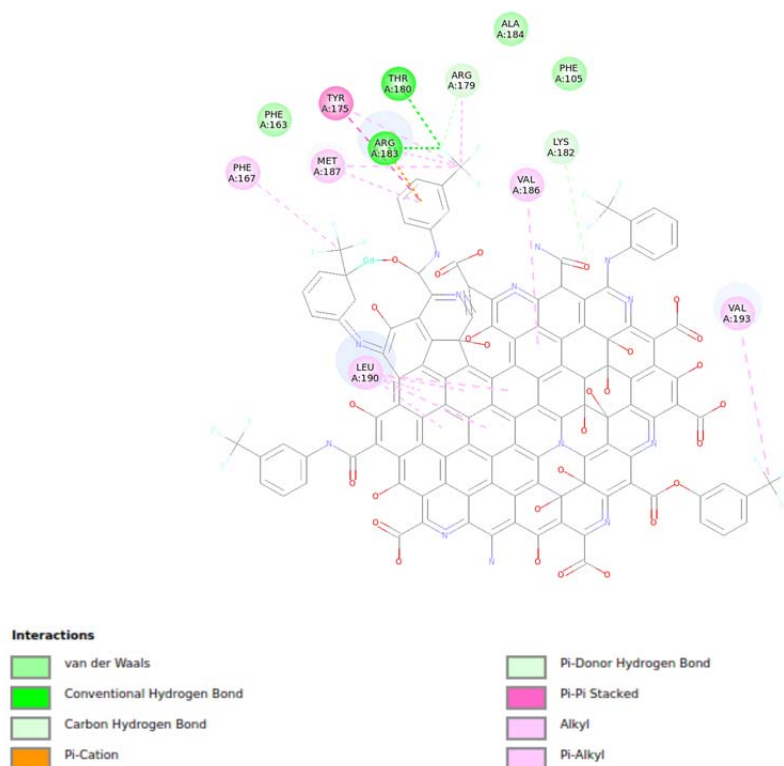


Рис. 3.5 2Д діаграма взаємодії між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом BAGd.

Таблиця 3.5 Результати проведеного докінгу між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом BAGd

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-5.5	0.000	0.000
2	-5.4	3.595	16.790
3	-4.7	5.958	15.588
4	-4.6	1.751	2.400
5	-4.4	4.492	17.360
6	-4.4	14.920	21.795
7	-4.3	2.198	2.622
8	-4.2	3.028	11.003
9	-3.8	3.286	11.272
10	-3.8	3.688	11.377

Розглянемо частинку BAGd з внутрішньоклітинного боку (див. Рис.3.6), на 2Д діаграмі можна побачити амінокислотні залишки які утворюють сайт зв'язування, 9 з 10 досліджуваних частинок проходили повністю через мембрану, а отже вони нам не підходять. Одна частинка яка нам підходить має скорингову функцію : -9,5 ккал/моль. Перевага водневих зв'язків та скорингова функція -11,1 ккал/моль, свідчить що даний ліганд має гарну енергію зв'язування та очевидно підходить для подальших експериментів набагато краще, ніж частинка з позаклітинного боку.

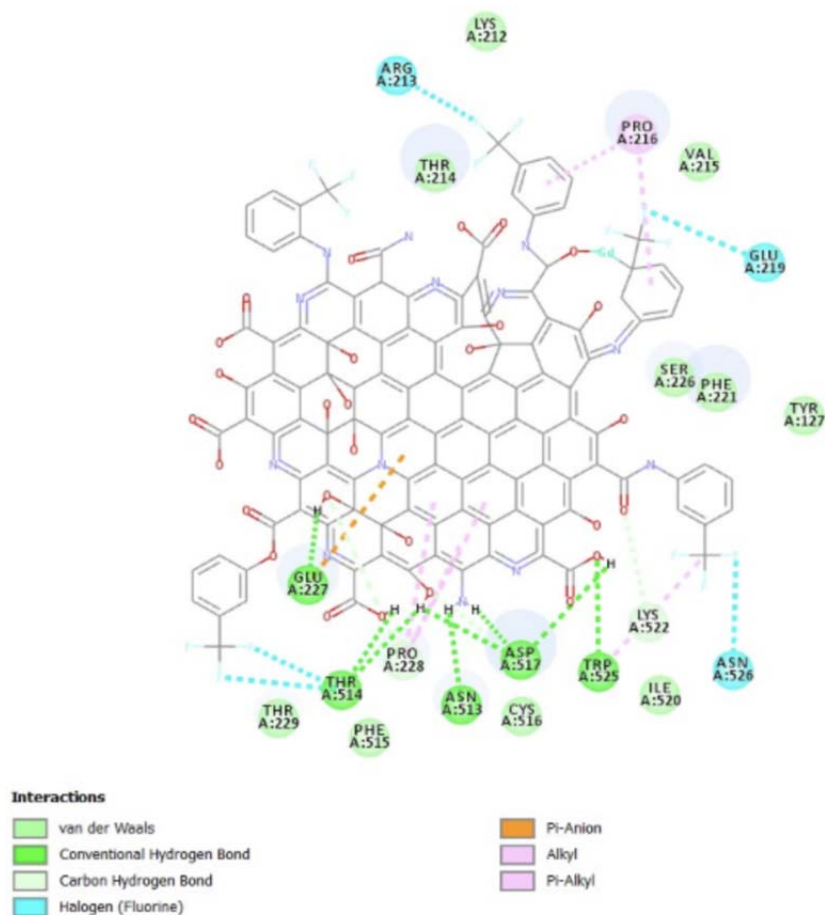


Рис. 3.6 2Д діаграма взаємодії між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору M3 та лігандом BAGd

Таблиця 3.6 Результати проведеного докінгу між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору M3 та лігандом BAGd

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-11.1	0.000	0.000
2	-10.3	1.683	2.004
3	-9.9	11.559	19.682
4	-9.6	2.346	3.076
5	-9.5	34.335	40.942
6	-9.3	33.220	40.024
7	-9.2	3.886	14.929
8	-9.1	27.857	30.535
9	-9.0	4.015	17.209
10	-9.0	3.657	14.187

З позаклітинного боку розглянемо наступну частинку GAGd (див. Рис.3.7). В даному випадку LYS93 та LYS96 утворюють електростатичні взаємодії, а саме Pi-Cation з ароматичним кільцем. Дана взаємодія утворюється між позитивно зарядженим атомом та ароматичним кільцем, на 2Д діаграмі можна звернути увагу що Pi-Cation лізин саме розташовується в ароматичному кільці. Також маємо наявність гідрофобних взаємодій, і що важливо повну відсутність водневих зв'язків. Хоча без водневих зв'язків комплекс існувати може, але все ж вони відіграють важливу роль в стабілізації взаємодії білок-ліганд.

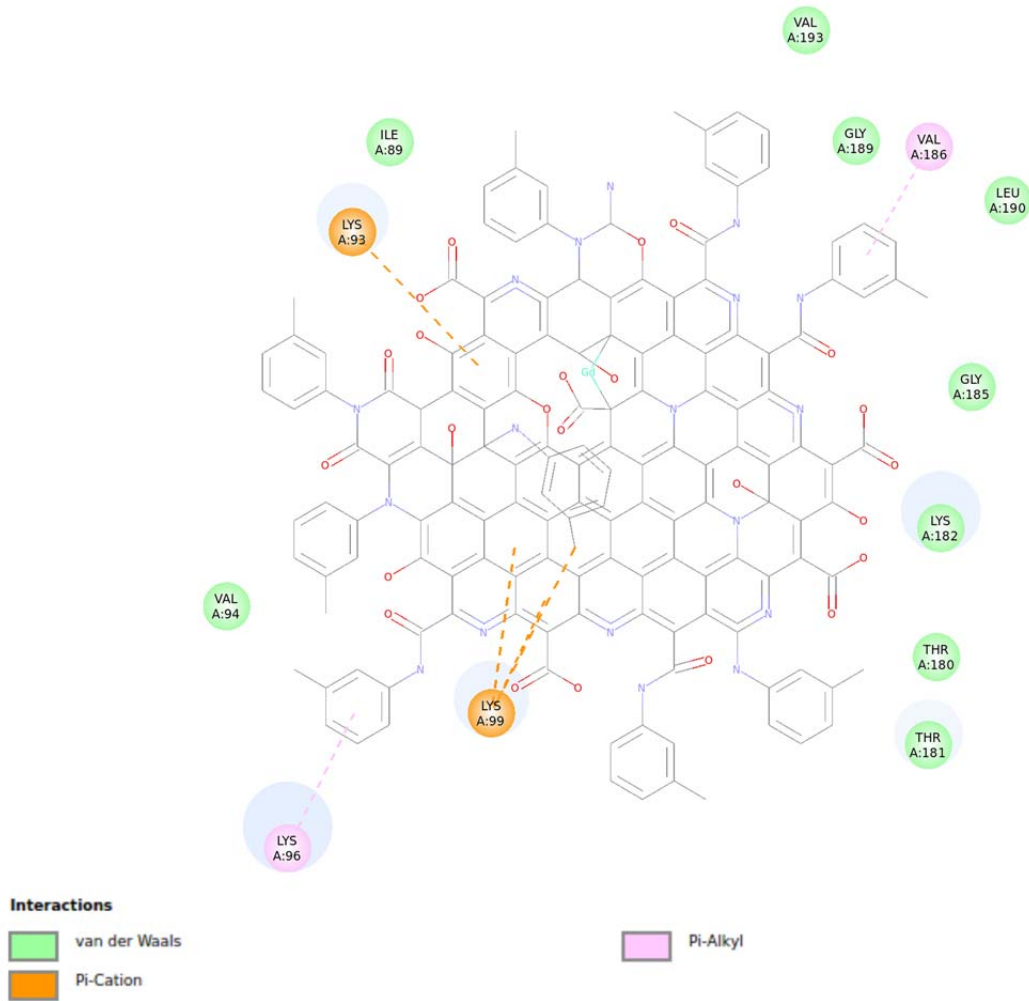


Рис. 3.7 2Д діаграма взаємодії між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом GAGd

Таблиця 3.7 Результати проведеного докінгу між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом GAGd

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-6.2	0.000	0.000
2	-5.4	1.318	1.808
3	-3.8	1.213	1.639

З внутрішньоклітинного боку частинка GAGd (див. Рис.3.8)показала наступні результати, в першу чергу можна сказати, що ми відібрали 4 з 10 варіантів ліганду за ранжуванням вільної енергії зв'язування, скорингова функція - 10.0 ккал/моль. З огляду на 2Д діаграму можна побачити переважаючу кількість ван-дер-ваальсових зв'язків. Також спостерігаємо велику кількість Pi Alkyl взаємодії із PRO216, PRO217, LYS212 в гетероароматичному кільці, що вказує на гідрофобність частинки.

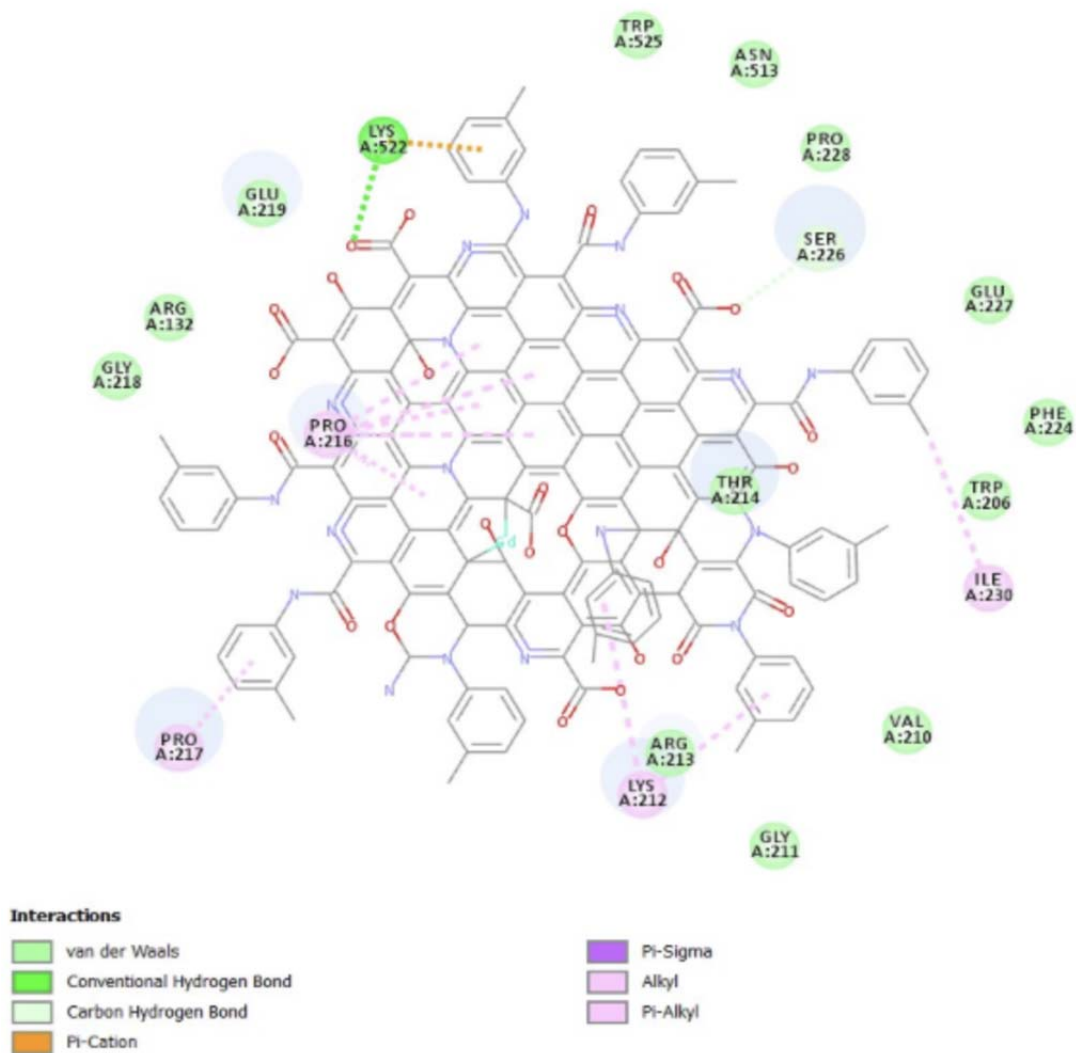


Рис. 3.8 2Д діаграма взаємодії між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 з кодом 4DAJ та лігандом GAGd, візуалізовано – Discovery Studio.

Таблиця 3.8 Результати проведеного докінгу між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору M3 та лігандом GAGd.

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-11.5	0.000	0.000
2	-11.0	3.031	11.084
3	-10.2	13.344	25.851
4	-10.0	14.860	26.733
5	-10.0	14.300	24.225
6	-10.0	35.658	42.937
7	-9.9	13.564	24.826
8	-9.8	17.542	26.381
9	-9.6	37.032	43.255
10	-9.6	32.596	41.133

Наступна частинка TAGd (див. Рис.3.9), яка показала найкращий варіант енергії зв'язування -10,3 ккал/моль, враховуючи малу невелику кількість амінокислотних залишків на поверхні під час докінгу, цей результат є потенційно хорошим в подальших експериментах. Більше того тут спостерігається значна кількість водневих зв'язків, їх утворюють THR181, ARG178, ARG165, GLN97, THR100, ARG176.

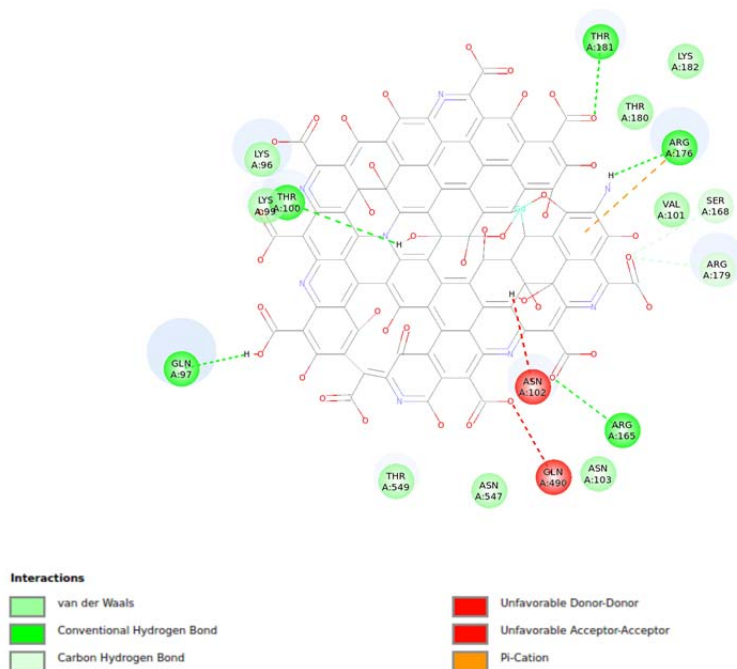


Рис. 3.9 2Д діаграма взаємодії між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом TAGd

Таблиця 3.9 Результати проведеного докінгу між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом TAGd

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-10.3	0.000	0.000
2	-8.5	13.154	18.293
3	-8.3	11.170	18.997
4	-8.0	12.870	20.400
5	-7.7	17.447	26.362
6	-7.5	10.890	19.253

З внутрішньоклітинного боку частинка TAGd (див. Рис.3.10)показує вищу енергію зв'язування -10.7 ккал/моль, а також має водневі зв'язки : ASN131, ILE129, THR523 та гідрофобну взаємодію PRO521. З огляду на

порівняння обох скорингових функцій частинок, кращу афінність показує комплекс з внутрішньоклітинного боку.

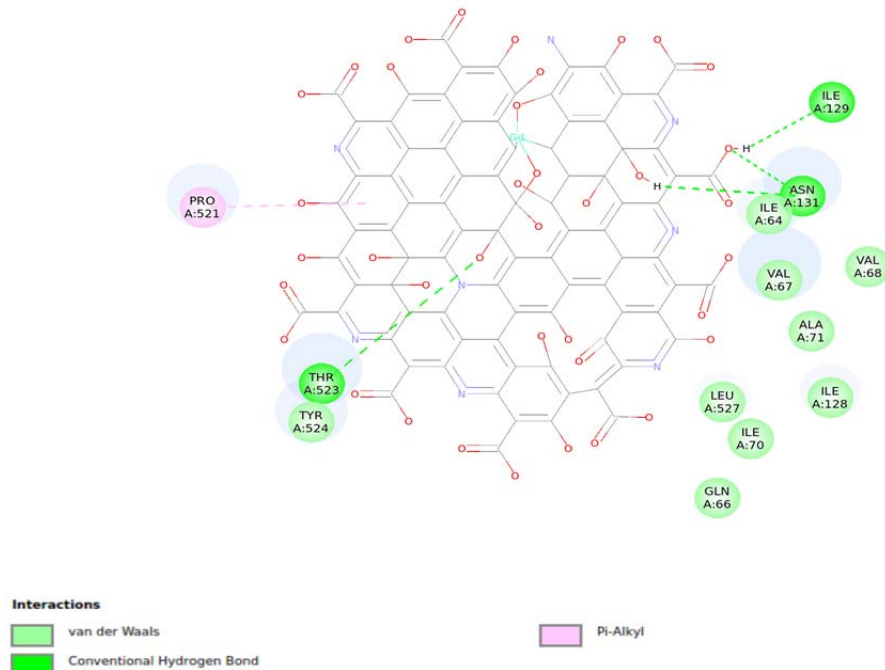


Рис. 3.10 2Д діаграма взаємодії між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом TAGd.

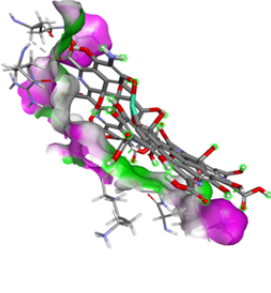
Таблиця 3.10 Результати проведеного докінгу між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом TAGd

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-10.7	0.000	0.000
2	-10.2	11.356	19.746
3	-9.9	29.438	32.577
4	-9.8	12.825	21.514
5	-9.6	15.024	23.466
6	-9.6	29.527	33.253
7	-9.6	15.819	24.257
8	-9.5	9.548	18.286
9	-9.3	2.993	7.852
10	-9.2	2.604	13.695

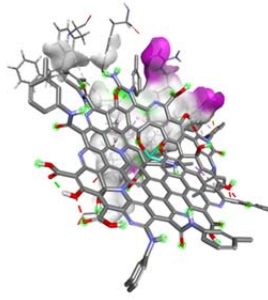
3.1.1 Результати взаємодії гадоліній-вмісних нанокompatитів з позаклітинною стороною білка

З огляду на результати найкращу енергію взаємодії показала частинка TAGd з скоринговою функцією: -10,3 ккал/моль. Враховуючи геометрію всіх сполук можна сказати що, дана частинка стикується найкраще, оскільки, гадоліній вигнутий в сторону області взаємодії. Варто зазначити що частинка TAGd, також має велику площу поверхні та амінокислотний склад, що призводить до утворення великої кількості водневих зв'язків. Для порівняння, в інших сполуках гадоліній змінив конформацію таким чином, що він стикується гірше, а отже скорингова функція є нижчою, що призводить до утворення меншої кількості водневих зв'язків.

Таблиця 3.11 Візуалізоване представлення області взаємодії позаклітинної сторони гадоліній-вмісних нанокompatитів з білком структури мускаринового холінорецептору M3, візуалізовано – Discovery Studio (тут і далі)

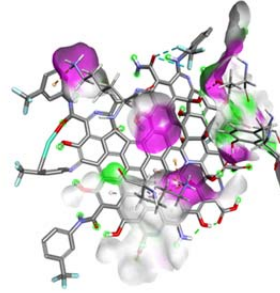
Назва частинки, позаклітинна сторона	Площа взаємодії позаклітинної сторони білка з лігандами
CAGd	

DAGd



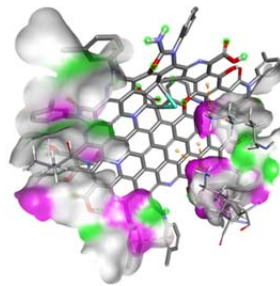
H-Bonds
Donor
Acceptor

BAGd



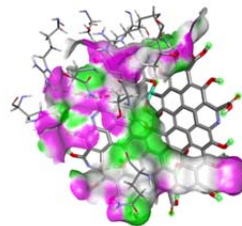
H-Bonds
Donor
Acceptor

GAGd



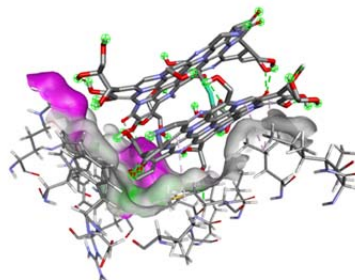
H-Bonds
Donor
Acceptor

TAGd



H-Bonds
Donor
Acceptor

2AGd



H-Bonds
Donor
Acceptor

Таблиця 3.12 Значення представлення області взаємодії позаклітинної сторони гадоліній-вмісних наноконкомпозитів з білком структури мускаринового холінорецептору M3, результати отримано – Discovery Studio. (тут і далі)

Назва частинки	CAGd	DAGd	BAGd	GAGd	TAGd	2AGd
Об'єм Å ³	33681,4	33714,5	33714,5	33681,4	33681,4	33681,4
Площа поверхні Å ²	465,161	338,124	380,43	464,616	545,693	443,761

Таблиця 3.13 Скорингова функція взаємодії комплексу ліганд-білок позаклітинної сторони гадоліній-вмісних наноконкомпозитів з білком структури мускаринового холінорецептору M3, результати отримано – SMINA. (тут і далі)

Назва частинки	CAGd	DAGd	BAGd	GAGd	TAGd	2AGd
Енергія зв'язування, ккал/моль	-8,8	-4,0	-5,5	-6,2	-10,3	-5.2

Таблиця 3.14 Водневі зв'язки взаємодії гадоліній-вмісних наноконкомпозитів з позаклітинною стороною білка 4DAJ

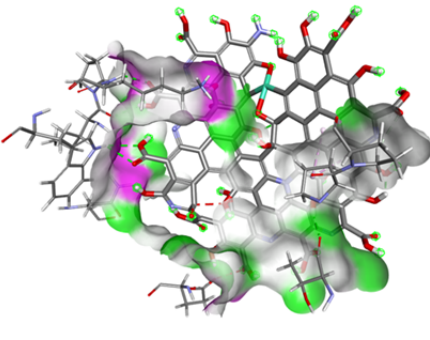
Назва частинки	Кількість та назва водневих зв'язків	
CAGd	A:ARG176:HH11 - Molecule:O140 Molecule:H115 - A:LYS99:O Molecule:H118 - A:ARG176:O	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond
	Molecule:H157 - A:GLN97:OE1 A:ARG176:HA - Molecule:O140 A:ARG179:HD1 - Molecule:O140	Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond

DAGd	A:LYS182:HE1 - Molecule:O97	Carbon Hydrogen Bond
BAGd	A:GLY185:HA1 - Molecule:O146	Carbon Hydrogen Bond
GAGd	Відсутність водневих зв'язків	
TAGd	A:ARG165:HH21 - Molecule:O143 A:THR181:HN - Molecule:O131 Molecule:H115 - A:THR100:OG1 Molecule:H116 - A:ARG176:O Molecule:H157 - A:GLN97:OE1 A:SER168:HB2 - Molecule:O140 A:ARG179:HD1 - Molecule:O140	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond
2AGd	A:ARG183:HH21 - Molecule:O179 A:ARG183:HH22 - Molecule:O54 A:ARG183:HH22 - Molecule:O61 Molecule:H156 - A:ARG183:O	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond

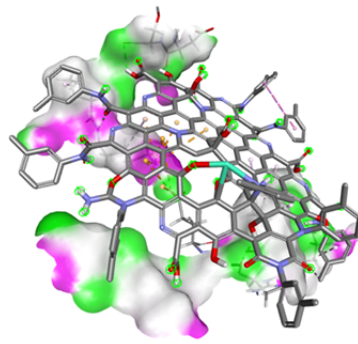
3.1.2 Результати взаємодії гадоліній-вмісних нанокompatитів з внутрішньоклітинною стороною білка

Найбільшу афінність з внутрішньоклітинної сторони білка виявляють: CAGd та TAGd, які мають однакову скорингову функцію – 10,7 ккал/моль. Конформація гадолінію в даних сполуках є більш сприятливою до утворення стабільних комплексів, оскільки, геометрія гадолінію направлена до області взаємодії та відповідно краще стикується. Це призвело до того, що утворилось менше гідрофобних та електростатичних взаємодій в порівнянні з іншими частинками. Наприклад, гадоліній в частинці BAGd вигнутий від площі взаємодії, незважаючи на велику кількість водневих зв'язків, він до того ж утворює велику кількість несприятливих взаємодій. Ці всі фактори зменшують загальну афінність. Частинка 2AGd утворює багато водневих зв'язків, оскільки, площа взаємодії відповідно є великою, але афінність -6,8 ккал/моль.

Таблиця 3.15 Візуалізоване представлення області взаємодії внутрішньоклітинної сторони гадоліній-вмісних нанокompatитів з білком структури мускаринового холінорецептору М3.

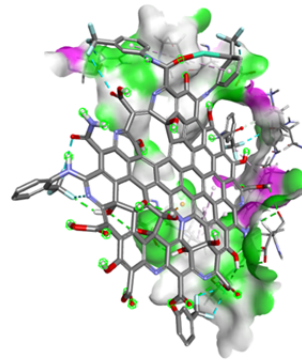
Назва частинки, внутрішньокліт. сторона	Площа взаємодії ліганд - білок
CAGd	

DAGd



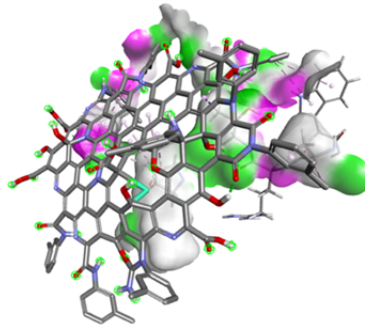
H-Bonds
Donor
Acceptor

BAGd



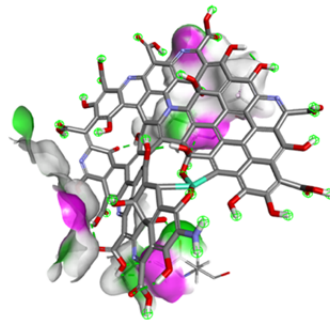
H-Bonds
Donor
Acceptor

GAGd

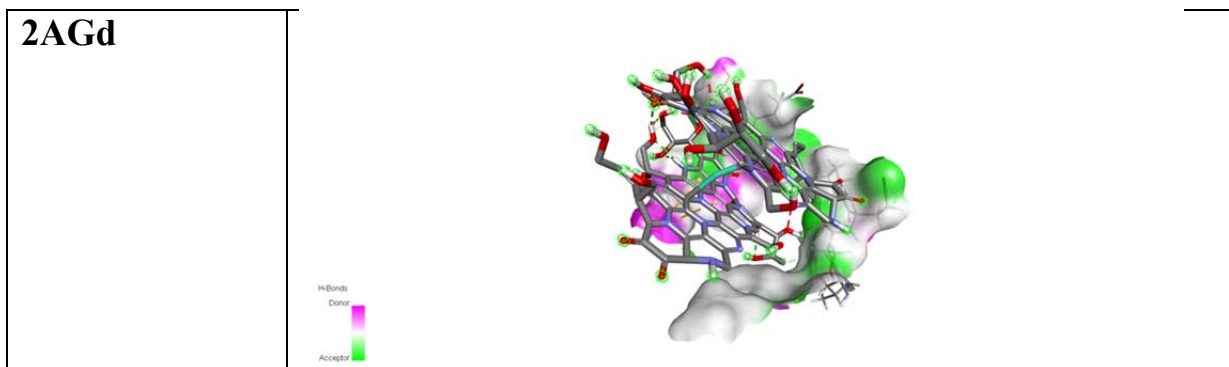


H-Bonds
Donor
Acceptor

TAGd



H-Bonds
Donor
Acceptor



Таблиця 3.16 Значення представлення області взаємодії внутрішньоклітинної сторони гадоліній-вмісних нанокompatитів з білком структури мускаринового холінорецептору М3

Назва частинки	CAGd	DAGd	BAGd	GAGd	TAGd	2AGd
Об'єм Å^3	55494,8	55494,8	55494,8	55494,8	55494,8	55494,8
Площа поверхні Å^2	438,098	611,474	447,457	395,839	483,614	491,078

Таблиця 3.17 Скорингова функція взаємодії комплексу ліганд-білок внутрішньої сторони гадоліній-вмісних нанокompatитів з білком структури мускаринового холінорецептору М3

Назва частинки	CAGd	DAGd	BAGd	GAGd	TAGd	2AGd
Енергія зв'язування, ккал/моль	-10,7	-10,1	-9,5	-10,0	-10,7	-6,8

Таблиця 3.18 Водневі зв'язки взаємодії гадоліній-вмісних нанокompatитів з внутрішньоклітинною стороною білка 4DAJ

Назва частинки	Кількість та назва водневих зв'язків	
CAGd	A:ASN513:HD22 - Molecule:O105 A:LYS522:HN - Molecule:O143 A:TRP525:HE1 - Molecule:O147	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond
	A:TRP525:HE1 - Molecule:O148 Molecule:H108 - A:THR214:O Molecule:H113 - Molecule:O97	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond
DAGd	A:LYS522:HN - Molecule:O195 Molecule:H107 - A:ASP517:O	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond
	Molecule:H109 - A:PRO217:O Molecule:H181 - A:SER518:O A:PRO521:HA - Molecule:O195 A:LYS182:HE1 - Molecule:O97	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond
BAGd	A:TRP525:HE1 - Molecule:O130 Molecule:H108 - A:ASP517:O Molecule:H109 - A:ASN513:O Molecule:H110 - A:GLU227:OE1	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond
	Molecule:H118 - A:THR514:O Molecule:H118 - A:ASP517:OD1 Molecule:H132 - A:ASP517:O Molecule:H136 - A:THR514:O A:PRO228:HD1 - Molecule:O88 A:ASP517:HA - Molecule:O87 A:LYS522:HE1 - Molecule:O155 A:GLY185:HA1 - Molecule:O146	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond
GAGd	A:LYS522:HZ1 - Molecule:O152 Molecule:H109 - A:ARG213:O	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond
	Molecule:H162 - A:THR214:OG1 A:LYS522:HE2 - Molecule:O152	Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond
TAGd	A:ASN131:HD22 - Molecule:O144 A:THR523:HG1 - Molecule:O93 Molecule:H119 - A:ASN131:OD1 Molecule:H145 - A:ILE129:O	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond

2AGd	A:ASN513:HD22 - Molecule:O48	Conventional Hydrogen Bond
	Molecule:H59 - A:ASP517:O	Conventional Hydrogen Bond
	Molecule:H71 - A:LEU225:O	Conventional Hydrogen Bond
	Molecule:H71 - A:SER226:O	Conventional Hydrogen Bond
	Molecule:H156 - A:ASP517:O	Conventional Hydrogen Bond
	Molecule:H180 - A:ASN513:OD1	Conventional Hydrogen Bond
	A:GLU227:HA - Molecule:O144	Carbon Hydrogen Bond
	A:PRO228:HD1 - Molecule:O144	Carbon Hydrogen Bond
	A:PRO228:HD2 - Molecule:O144	Carbon Hydrogen Bond
	A:SER518:HA - Molecule:O54	Carbon Hydrogen Bond
	A:SER518:HA - Molecule:O61	Carbon Hydrogen Bond
	A:LYS522:HE2 - Molecule:O88	Carbon Hydrogen Bond
	Molecule:C75 - A:LEU225:O	Carbon Hydrogen Bond

3.2 Дослідження молекулярних механізмів взаємодії нанокompatитів без гадолінію з мускариновими холінорецепторами М3 підтипу

Після проведеного докінгу нанокompatитів гадолінія, проведемо також експеримент із частинками без гадолінія, для того щоб порівняти результати і побачити відмінності. Докінг буде проводитись так само з обох сторін, внутрішньоклітинної і позаклітинної.

Перша частинка СА з позаклітинної сторони (див. Рис.3.11) на 2Д діаграмі показує ван-дер-ваальсові взаємодії та водневі зв'язки, це свідчить про хорошу стабільність сполуки, скорингова функцію -8,6 ккал/моль.

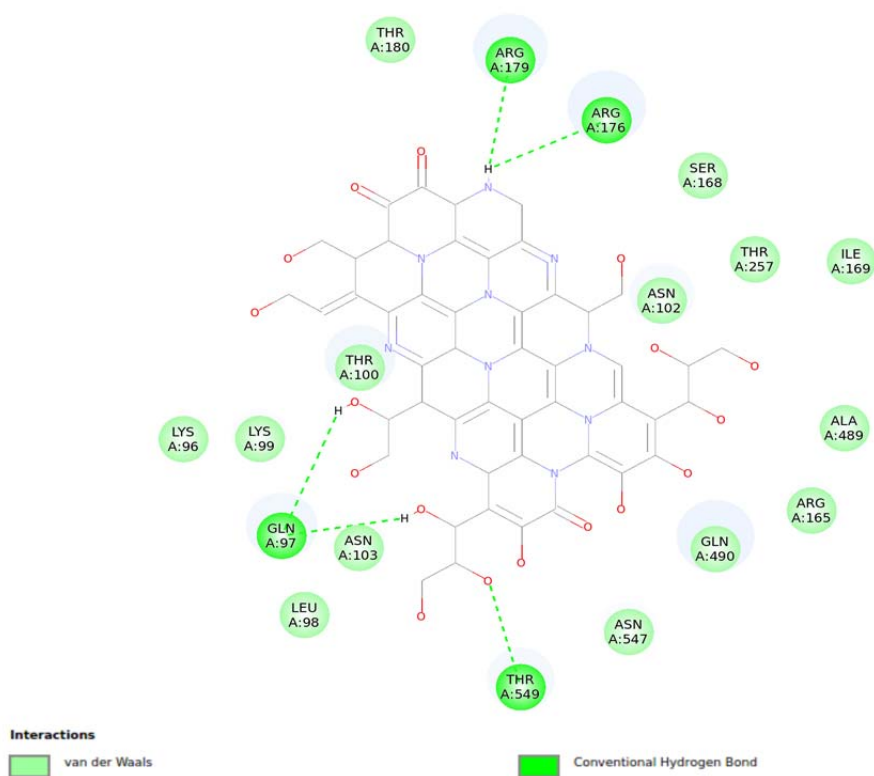


Рис. 3.11 2Д діаграма взаємодії між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом СА

Таблиця 3.19 Результати проведеного докінгу між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом СА

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-8.6	0.000	0.000
2	-7.9	2.510	9.240
3	-7.8	2.725	8.279
4	-7.7	1.913	11.308
5	-7.7	3.202	7.531
6	-7.5	2.259	10.873
7	-7.4	1.982	9.454
8	-7.4	3.281	8.773
9	-7.3	2.775	8.619
10	-7.3	1.990	9.749

Оглянемо тепер частинку СА з внутрішньоклітинного боку (див. Рис.3.12). На 2Д діаграмі можна побачити несприятливу взаємодію, яка виникає внаслідок стеричного ефекту в з'єднаннях. Несприятлива взаємодія донор-донор утворюється з THR231 та атомом водню. Енергія зв'язування -9,2. Амінокислотний залишок PRO216 утворює гідрофобну взаємодію в ароматичному кільці.

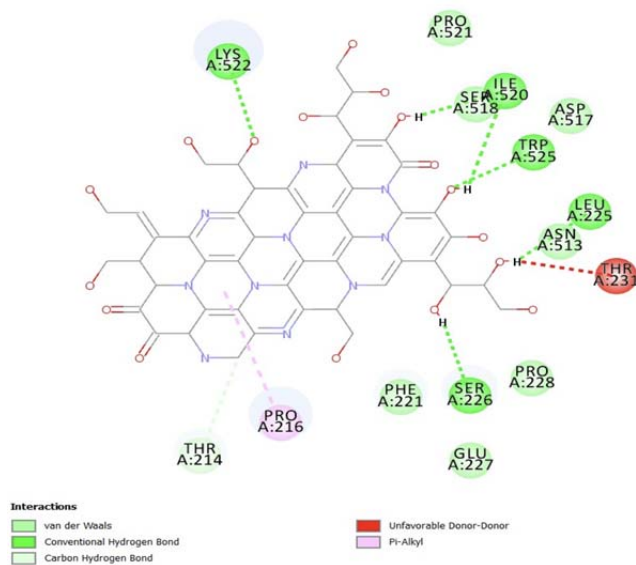


Рис. 3.12 2Д діаграма взаємодії між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом СА

Таблиця 3.20 Результати проведеного докінгу між внутрішньою стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом СА

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-9.2	0.000	0.000
2	-8.3	15.708	19.434
3	-8.1	18.231	22.441

4	-8.0	1.231	7.413
5	-7.9	17.295	20.324
6	-7.9	21.714	23.691
7	-7.7	23.966	25.891
8	-7.6	24.242	26.773
9	-7.6	16.630	22.288
10	-7.5	24.053	25.655

Наступна частинка DA з якою був проведений докінг на позаклітинній стороні (див. Рис.3.13). Найкраща скорингова функція $-7,9$. Присутні водневі зв'язки, але ван-дер-ваальсові взаємодії переважають за кількістю.

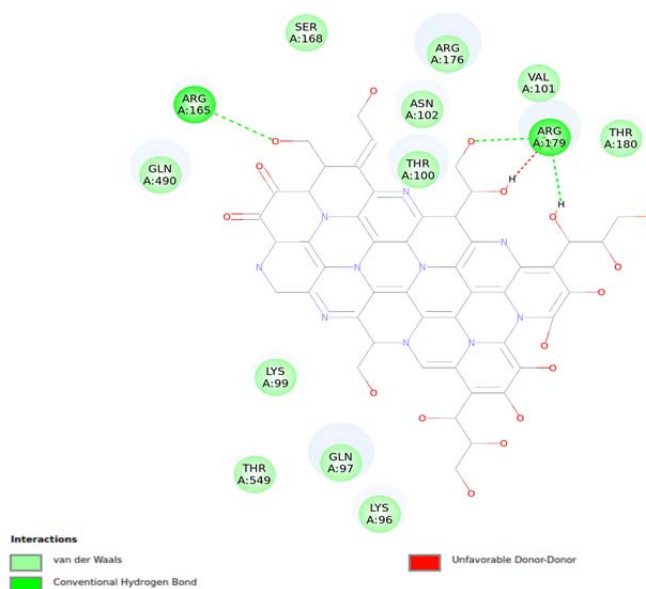


Рис. 3.13 2Д діаграма взаємодії між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом DA.

Таблиця 3.21 Результати проведеного докінгу між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору M3 та лігандом DA

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-7.9	0.000	0.000
2	-7.8	2.919	9.364
3	-7.8	2.100	9.353
4	-7.7	2.231	9.436
5	-6.7	16.017	21.158
6	-6.6	2.786	8.812
7	-6.3	2.484	9.680
8	-6.2	16.749	19.955
9	-6.1	3.025	8.594
10	-5.9	15.393	18.917

Проаналізуємо частинку DA з внутрішньоклітинного боку (див. Рис.3.14). З огляду на скорингову функцію -8,0 ккал/моль можемо побачити що енергія зв'язування є доволі низькою в порівнянні з іншими внутрішньоклітинними частинками. Також несприятлива взаємодія донор-донор утворюється із THR231. Амінокислотний залишок LYS522 утворює електростатичну взаємодію з гетероароматичним кільцем, а PRO216 відповідно гідрофобну взаємодію.

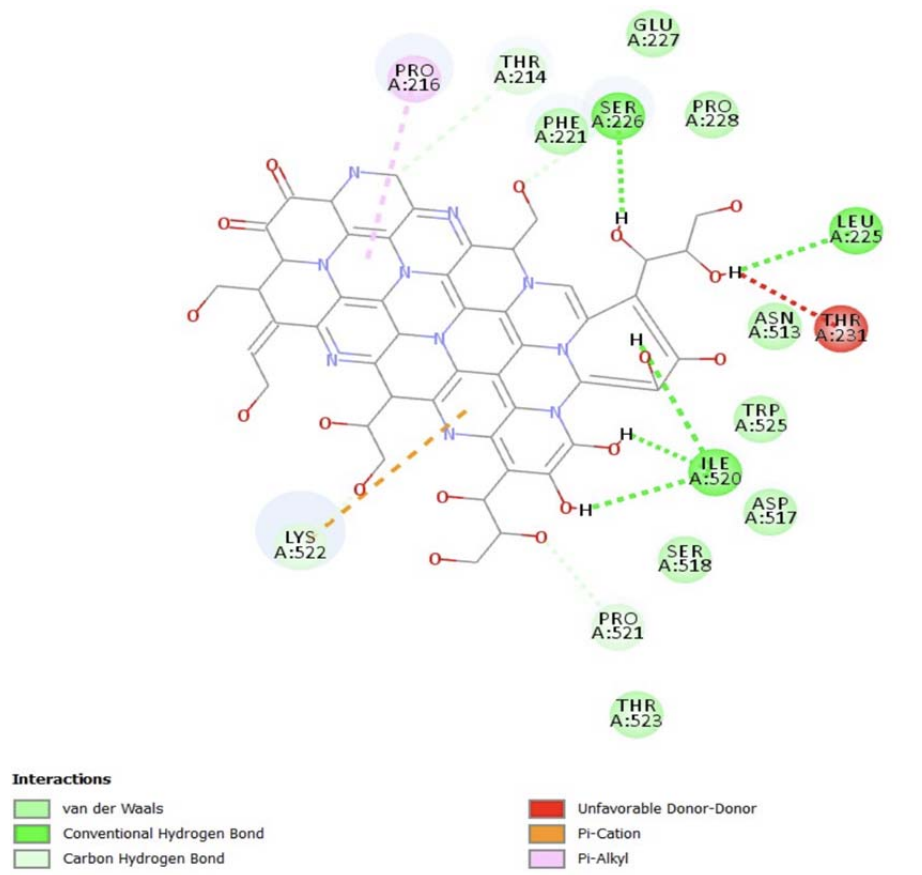


Рис. 3.14 2Д діаграма взаємодії між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом DA.

Таблиця 3.22 Результати проведеного докінгу між внутрішньою стороною білка структури мускаринового холінорецептору M3 та лігандом DA

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-8.0	0.000	0.000
2	-7.9	17.807	21.924
3	-7.8	16.079	19.899
4	-7.8	23.302	24.586
5	-7.7	24.580	26.759
6	-7.7	18.480	21.384
7	-7.6	16.722	23.504
8	-7.5	18.059	21.905
9	-7.5	17.784	23.966
10	-7.2	17.174	22.918

Наступна частинка BA з позаклітинного боку (див. Рис.3.15) білка має велику афінність, а саме скорингова функція -10,7 ккал/моль. GLN97 утворює Pi Sigma зв'язок, а саме pi-електронна система ароматичного кільця взаємодіє з сигма-електронною областю глутаміну. Амінокислотні залишки LYS96, THR100, ARG179 утворюють водневі зв'язки. В цілому частинка показала гарні результати, але ми маємо лише 7 варіантів молекул, що пояснюється відсутністю певних амінокислотних залишків, за рахунок малої площі взаємодії комплексу ліганд-білок.

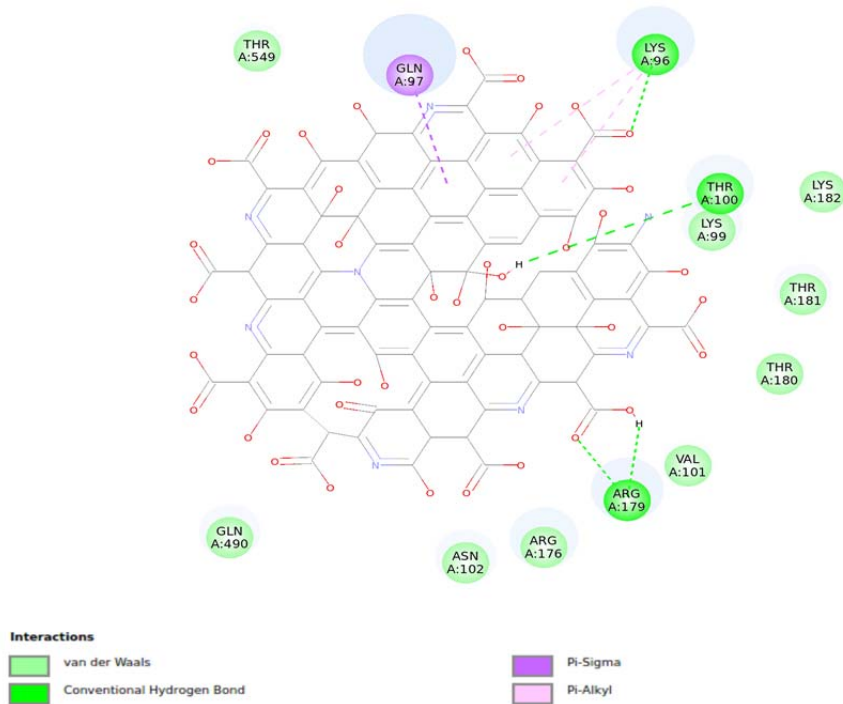


Рис. 3.15 2Д діаграма взаємодії між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом ВА.

Таблиця 3.23 Результати проведеного докінгу між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом ВА

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-10.7	0.000	0.000
2	-9.7	1.866	13.399
3	-9.1	1.670	10.321
4	-8.9	1.684	10.366
5	-8.0	1.677	9.464
6	-7.9	14.032	20.059
7	-7.9	2.059	9.531

З внутрішньоклітинного боку частинка ВА (див. Рис.3.16) має дещо вищу скорингову функцію, ніж з позаклітинного. На 2Д діаграмі видно, що амінокислотні залишки GLU219 та PRO216, утворюють Pi-Cation та Pi-

Алкул в гетероароматичному кільці відповідно. Тобто тут також присутні електростатичні взаємодії, гідрофобні та водневі зв'язки.

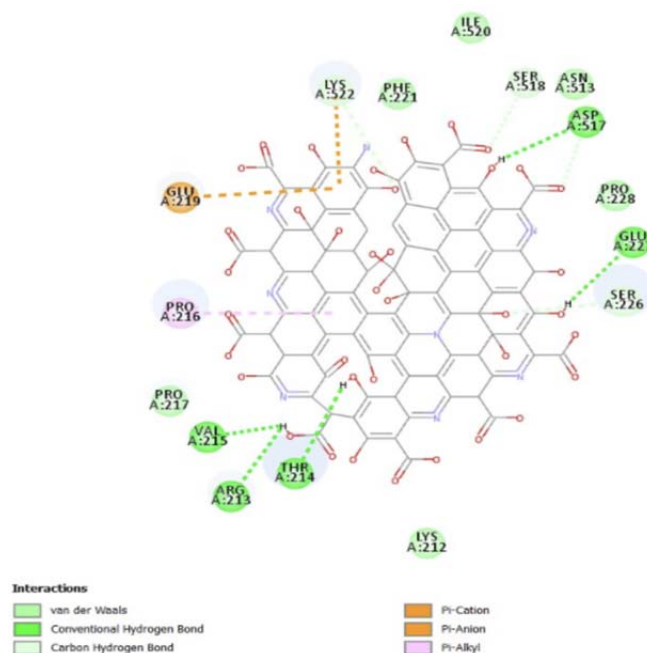


Рис. 3.16 2Д діаграма взаємодії між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом ВА.

Таблиця 3.24 Результати проведеного докінгу між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом ВА

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-10.9	0.000	0.000
2	-10.8	26.024	33.648
3	-10.6	24.981	32.025
4	-10.3	26.254	33.514
5	-10.3	26.058	34.763
6	-10.2	2.161	2.828
7	-10.2	25.708	32.772
8	-9.9	4.037	13.792
9	-9.9	25.753	32.521
10	-9.7	29.488	35.395

Наступна частинка GA взаємодіє на позаклітинній стороні (див. Рис.3.17). З огляду на 2Д діаграму взаємодії, можна побачити велику кількість водневих та ван-дер-ваальсових взаємодій. Скорингова функція – 8,4 ккал/моль.

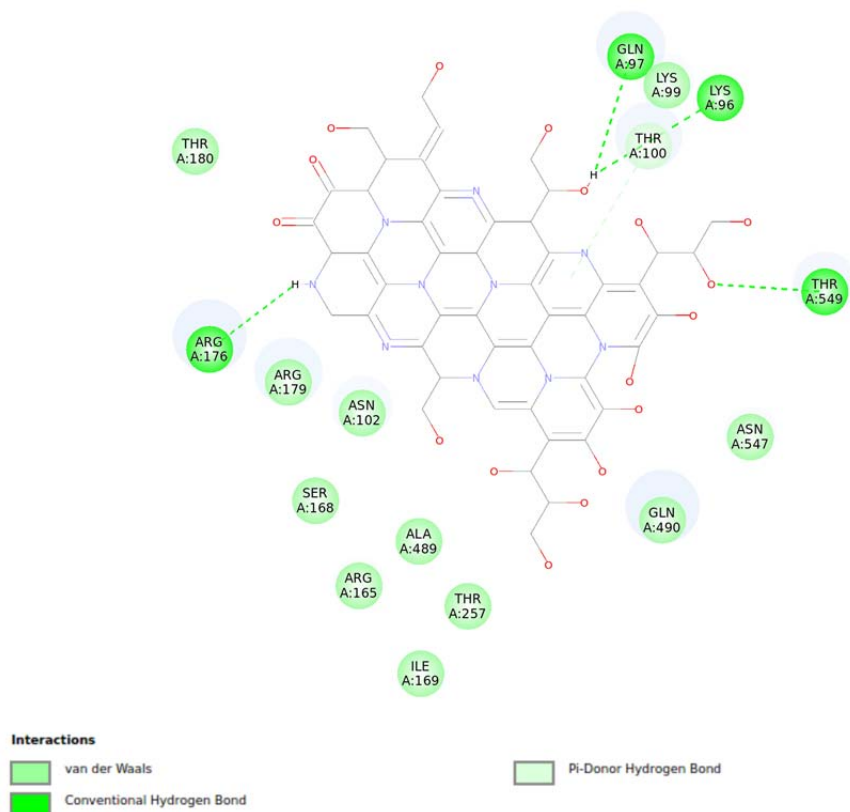


Рис. 3.17 2Д діаграма взаємодії між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом GA.

Таблиця 3.25 Результати проведеного докінгу між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору M3 та лігандом GA

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-8.4	0.000	0.000
2	-8.1	1.901	11.477
3	-8.0	3.078	9.057
4	-7.9	2.090	8.597
5	-7.8	2.143	10.741
6	-7.7	3.923	9.824
7	-7.4	1.930	9.609
8	-7.3	2.165	9.770
9	-7.3	1.769	3.016
10	-7.2	2.600	8.273

З огляду на внутрішньоклітинну частинку GA (див. Рис.3.18) ми бачимо певні відмінності. В першу чергу це нижча афінність, а саме -8.0. Амінокислотний залишок PRO216 утворює гідрофобну взаємодію з ароматичним кільцем, а LYS522 утворює водневий зв'язок та електростатичну взаємодію з ароматичним кільцем.

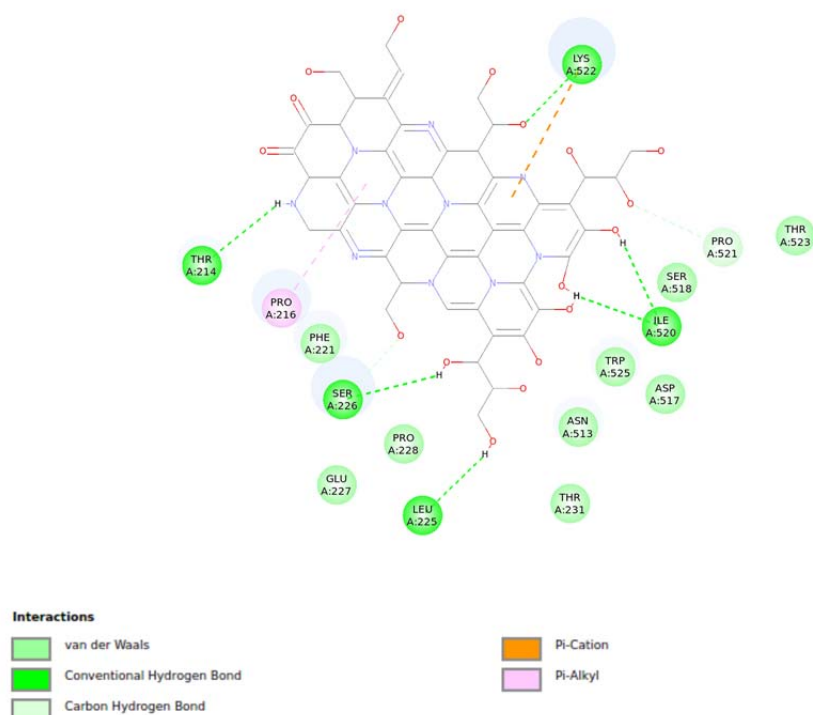


Рис. 3.18 2Д діаграма взаємодії між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом GA.

Таблиця 3.26 Результати проведеного докінгу між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом GA

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-8.0	0.000	0.000
2	-7.6	1.993	7.569
3	-7.6	16.100	19.932
4	-7.5	18.005	21.974
5	-7.5	25.032	27.781
6	-7.5	24.608	26.817
7	-7.5	23.481	24.524
8	-7.3	17.440	23.679
9	-7.3	4.624	9.901
10	-7.2	16.487	22.511

Наступна частинка ГА з позаклітинного боку (див. Рис.3.19) має скорингову функцію -3,5 ккал/моль. Це пояснюється відсутністю великої кількості зв'язків. Наявні лише водневий зв'язок LYS182, гідрофобні взаємодії в ароматичних кільцях : VAL186, LEU190. Ліганд ГА має складну геометрію сполуки, а саме видозмінено положення гадолінію, вигнутий від області взаємодії. Також ми отримали лише дві варіації ліганду.

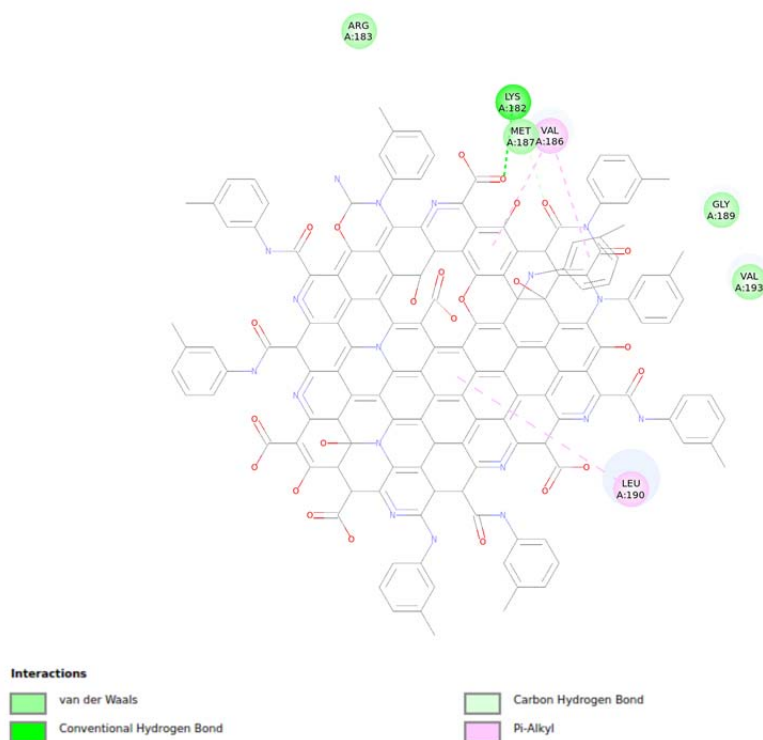


Рис. 3.19 2Д діаграма взаємодії між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом ГА.

Таблиця 3.27 Результати проведеного докінгу між позаклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом ГА

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-3.5	0.000	0.000
2	-2.2	2.791	12.231
3	-0.7	3.779	12.781

З внутрішньоклітинного боку частинка ТА (див.Рис.3.20) має найкращу скорингову функцію -9,6 ккал/моль хоча перевірявши всі частинки було визначено що лише частинка з афінністю -8,6 ккал/моль підходить нам, адже тільки вона не заходить в мембрану. З огляду на 2Д діаграму можна сказати, що взаємодія білок - ліганд утворює безліч різних зв'язків, а саме: електростатичні взаємодії GLU219, LYS522 з гетероциклічними ароматичними кільцями, гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками PRO216, PRO228, LYS212. Водневі зв'язки з амінокислотними залишками PRO217, GLU219, а також ван-дер-ваальсові взаємодії.

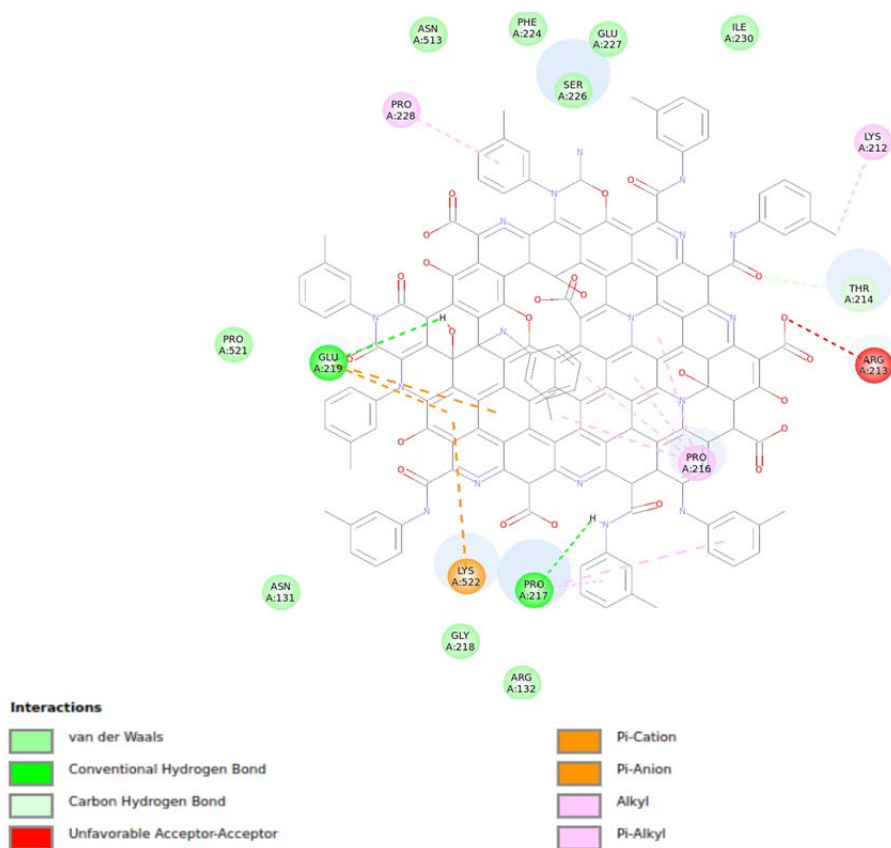


Рис. 3.20 2Д діаграма взаємодії між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом ТА.

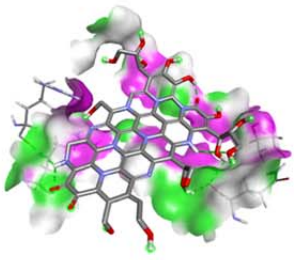
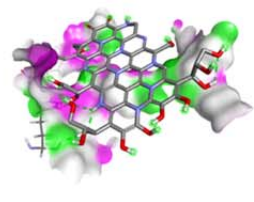
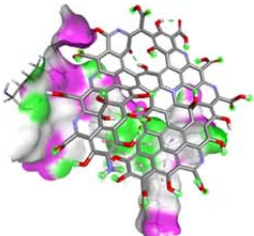
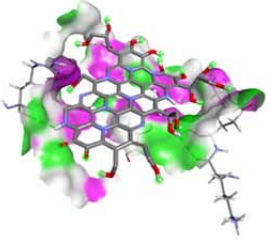
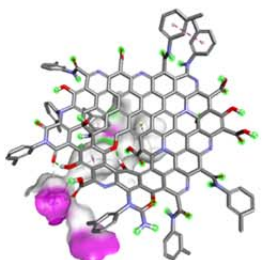
Таблиця 3.28 Результати проведеного докінгу між внутрішньоклітинною стороною білка структури мускаринового холінорецептору М3 та лігандом GA

Позиція	Енергія зв'язування, ккал/моль	Середньо квадратичне відхилення від початкової пози	Середньо квадратичне парне відхилення
1	-9.6	0.000	0.000
2	-9.5	35.395	41.436
3	-9.3	1.613	2.170
4	-9.2	35.211	40.302
5	-9.1	3.348	12.959
6	-8.9	1.539	2.340
7	-8.8	35.506	42.126
8	-8.8	35.199	41.944
9	-8.6	36.979	43.004
10	-8.6	14.169	22.950

3.2.1 Результати взаємодії нанокompatитів без гадолінію з позаклітинною стороною білка

Враховуючи, відсутність певних амінокислотних залишків на поверхні через модифікацію позаклітинної сторони білка, частинка ВА показала найкращий результат -10,7 ккал/моль. Це супроводжується геометрією сполуки, таким чином що, її конформація направлена до площі поверхні. Тому, частинка ВА має найкращу афінність, враховуючи стабільний комплекс амінокислотних залишків який забезпечується водневими зв'язками. Порівнюючи з частинкою ТА у якої скорингова функція -3,5 ккал/моль, можна звернути увагу на те, що геометрія даної сполуки не прилягає до області взаємодії, більше того даний ліганд має найнижчу площу поверхні.

Таблиця 3.29 Візуалізоване представлення області взаємодії позаклітинної сторони без гадолінієвих нанокompatитів з білком структури мускаринового холінорецептору М3.

Назва частинки, позаклітинна сторона	Площа взаємодії ліганд - білок
CA	
DA	
BA	
GA	
TA	

Таблиця 3.30 Значення представлення області взаємодії позаклітинної сторони без гадолінієвих нанокompозитів з білком структури мускаринового холінорецептору М3

Назва частинки	CA	DA	BA	GA	TA
Об'єм, А³	33714,5	33681,4	33681,4	33681,4	33681,4
Площа поверхні, А²	422,908	385,772	396,684	450,714	224,495

Таблиця 3.31 Скорингова функція взаємодії комплексу ліганд-білок позаклітинної сторони без гадолінієвих нанокompозитів з білком структури мускаринового холінорецептору М3

Назва частинки	CA	DA	BA	GA	TA
Енергія зв'язування, ккал/моль	-8,6	-7,9	-10,7	-8,4	-3,5

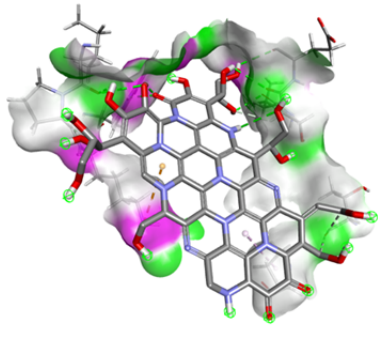
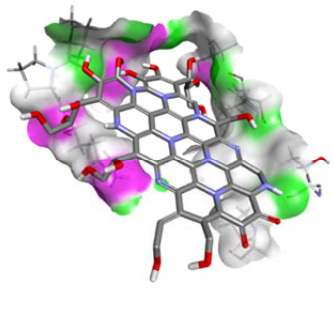
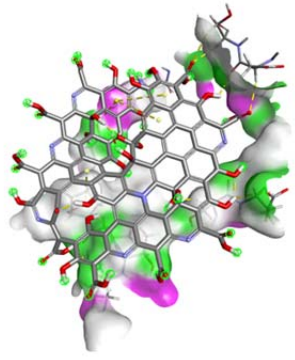
Таблиця 3.32 Водневі зв'язки взаємодії без гадолінієвих нанокompatитів з позаклітинною стороною білка 4DAJ

Назва частинки	Кількість та назва водневих зв'язків	
СА	A:THR549:HG1 – Molecule:O69 Molecule:H55 – A:ARG176:O Molecule:H55 – A:ARG179:O Molecule:H61 – A:GLN97:O Molecule:H67 – A:GLN97:O	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond
ДА	A:ARG165:HE – Molecule:O91 A:ARG179:HE – Molecule:O64 Molecule:H68 – A:ARG179:O A:ARG165:HE – Molecule:O91 A:ARG179:HE – Molecule:O64 Molecule:H68 – A:ARG179:O	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond
ВА	A:LYS96:HZ2 – Molecule:O132 A:ARG179:HE – Molecule:O144 A:ARG179:HH21 – Molecule:O144 Molecule:H126 – A:THR100:OG1 Molecule:H146 – A:ARG179:O	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond
ГА	A:THR549:HG1 – Molecule:O70 Molecule:H55 – A:ARG176:O Molecule:H62 - A:LYS96:O Molecule:H62 - A:GLN97:O	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond
ТА	A:LYS182:HZ1 - Molecule:O136 A:LYS182:HE1 - Molecule:O97	Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond

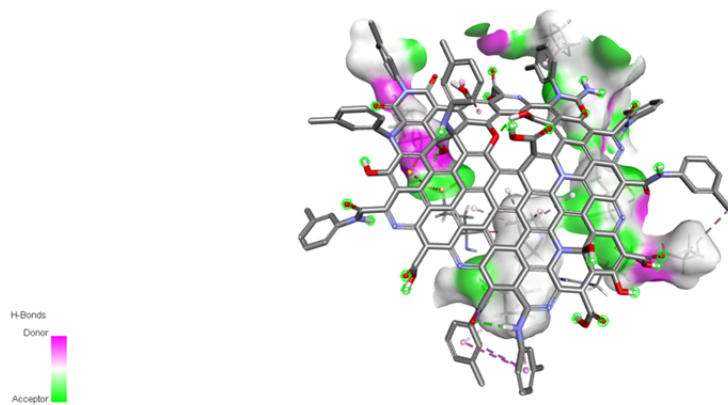
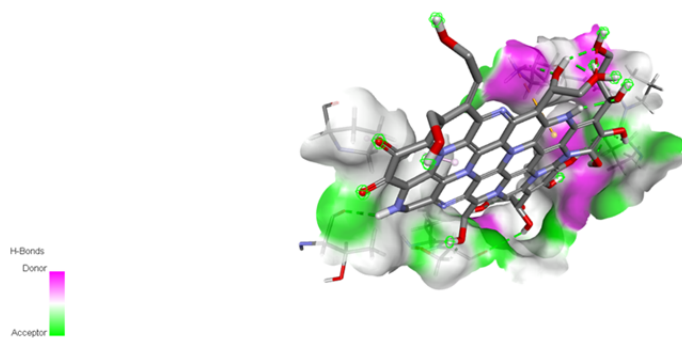
3.2.2 Результати взаємодії нанокompatитів без гадолінію з внутрішньоклітинною стороною білка

З огляду на результати, найкращу скорингову функцію, має частинка ВА: -10,9 ккал/моль. Область взаємодії щільно прилягає до поверхні ліганда, тобто геометрія сполуки мінімізує варіанти несприятливих взаємодій, тим самим збільшується енергія зв'язування. Амінокислотний склад даної частинки утворює значну кількість водневих зв'язків, до того ж площа поверхні є великою. Саме це і підтверджує факт утворення різних типів зв'язків у даному комплексі і відповідно велике значення афінності.

Таблиця 3.33 Візуалізоване представлення області взаємодії внутрішньоклітинної сторони без гадолінієвих наноконкомпозитів з білком структури мускаринового холінорецептору М3

Назва частинки, внутрішньокліт. сторона	Площа взаємодії ліганд - білок
СА	
DA	
ВА	

GA
TA



Таблиця 3.34 Значеннєве представлення області взаємодії внутрішньоклітинної сторони без гадолінієвих нанокмпозитів з білком структури мускаринового холінорецептору M3

Назва частинки	CA	DA	BA	GA	TA
Об'єм Å^3	55494,8	33681,4	55494,8	55494,8	55494,8
Площа поверхні Å^2	395,076	395,785	462,823	422,324	453,347

Таблиця 3.31 Скорингова функція взаємодії комплексу ліганд-білок внутрішньоклітинної сторони без гадолінієвих нанокompatитів з білком структури мускаринового холінорецептору М3

Назва частинки	СА	ДА	ВА	ГА	ТА
Енергія зв'язування, ккал/моль	-9,2	-8,0	-10,9	-8,0	-8,6

Таблиця 3.32 Водневі зв'язки взаємодії без гадолінієвих нанокompatитів з внутрішньоклітинною стороною білка 4DAJ

Назва частинки	Кількість та назва водневих зв'язків	
СА	A:LYS522:HZ1 - Molecule:O84 A:TRP525:HE1 - Molecule:O47 Molecule:H56 - A:ILE520:O Molecule:H57 - A:ILE520:O Molecule:H67 - A:SER226:O	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond
ДА	Molecule:H57 - A:ILE520:O Molecule:H58 - A:ILE520:O Molecule:H59 - A:ILE520:O Molecule:H77 - A:SER226:O Molecule:H80 - A:LEU225:O A:SER226:HB2 - Molecule:O85	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond
ВА	Molecule:H107 - A:GLU227:OE2 Molecule:H110 - A:ASP517:O Molecule:H124 - A:THR214:O Molecule:H154 - A:ARG213:O Molecule:H154 - A:VAL215:O A:SER226:HB2 - Molecule:O91 A:ASP517:HA - Molecule:O128 A:SER518:HA - Molecule:O132 A:SER518:HB2 - Molecule:O132 A:LYS522:HE1 - Molecule:O90	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond
ГА	A:LYS522:HZ1 - Molecule:O61 Molecule:H55 - A:THR214:O Molecule:H57 - A:ILE520:O Molecule:H58 - A:ILE520:O	Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond Conventional Hydrogen Bond

TA	Molecule:H109 - A:GLU219:OE1	Conventional Hydrogen Bond
	Molecule:H142 - A:PRO217:O	Conventional Hydrogen Bond
	A:THR214:HA - Molecule:O186	Carbon Hydrogen Bond
	A:LYS182:HZ1 - Molecule:O136	Conventional Hydrogen Bond
	A:LYS182:HE1 - Molecule:O97	Carbon Hydrogen Bond

Результати моделювання *in silico* добре узгоджуються з результатами експериментів *in vivo*. Так, у випадку ін'єктування щурам суспензії суто органічних нанокompatитів та нанокompatитів з Gd³⁺ (обидві вводили внутрішньовенно за годину до досліджень у дозах 10 мг/кг, що відповідають звичному дозуванню контрастуючих гадоліній-вмісних суспензій пацієнтам перед МРТ-дослідженнями), спостерігалось суттєве посилення скорочень гладеньких м'язів шлунку і товстого кишечника, опосередкованих активуванням мускаринових ацетилхолінових рецепторів агоністом карбахолом (10 мкМ). Так, за присутності органічних нанокompatитів (без Gd³⁺) мало місце зростання фазних компонентів карбахолінових скорочень м'язових препаратів товстого кишечника у середньому до 283,2 %, тоді як амплітуда тонічних компонентів залишалась на рівні контролю (становила у середньому 104,6 %). За тих же умов нанокompatити з Gd³⁺ спричиняли зростання фазних компонентів ацетилхолінових скорочень у середньому до 184,9 %, тоді як тонічна складова також не мала статистичних відмінностей від контролю (становила у середньому 111,9 %) [29].

Відомо, що фазний компонент карбахолін-активованих скорочень гладеньких м'язів товстого кишечника опосередковується стимулюванням саме мускаринових ацетилхолінових рецепторів М3-підтипу з наступним синтезом інозитом-1,4,5-трифосфату та активацією відповідних рецепторів у мембранах ендоплазматичного ретикулуму. Навпаки, тонічний компонент карбахолінових скорочень обумовлюється стимулюванням мембранних і клітинних процесів, пусковим механізмом яких є активація

M2-підтипу мускаринових холінорецепторів. [30] Тож можна передбачити, що за дії наноконкомплексів відбувається саме посилення M3-залежних процесів стимулювання скорочувальних відповідей. Такі ефекти можуть бути пов'язані, зокрема, із передбаченою *in silico* взаємодією наночастинок із позаклітинними та/або внутрішньоклітинними ділянками рецептора, та наступною індукцією переходу молекул рецептора у активований стан. Зокрема, можна передбачити, що ефекти стимулювання молекули рецептора і переведення його в конформацію, здатну спричиняти тривале активування Gq-протеїну, можуть обумовлюватися взаємодією з наночастиною у ділянці 514 амінокислотного залишку, критично важливого для конститутивної активації M3-холінорецептор.

ВИСНОВКИ

1. Гадоліній-вмісні частинки показали результати енергії зв'язування, що знаходяться у діапазоні від -4,0 ккал/моль до -10,3 ккал/моль, а саме: найкращий результат в частинки TAGd, а найгірший в DAGd. Таку залежність ми пов'язуємо із поверхнею взаємодії: у діапазоні від 338,124 Å² в частинці DAGd до 545,693 Å² в частинці TAGd.
2. Частинки без гадолінію мають енергії зв'язування, що знаходиться у діапазоні від -3,5 ккал/моль до -10,9 ккал/моль, відповідно найкраще зв'язана частинка BA, а найгірше TA. Площі поверхні взаємодії з білком для частинка TA 224,495 Å², а для частинка BA 462,863 Å².
3. Результати молекулярного докінгу із позаклітинного та внутрішньоклітинного боку оптимізованих лігандів вказують, що найкращу енергію зв'язування серед усіх має частинка BA без гадолінію із внутрішньоклітинного боку, це пояснюється тим, що гадоліній змінює конформацію всієї сполуки та він конформаційно стикується гірше.
4. У загальну логіку лягає і модифікована частинка 2AGd із двох вуглецевих точок та гадолінію, вона має малу площу взаємодії, а саме 243,761 Å² з позаклітинного боку та 291,078 Å² з внутрішньоклітинного боку. Відповідно, маючи скори із позаклітинного боку -5,2 ккал/моль, а з внутрішньоклітинного боку -6,8 ккал/моль.
5. Результати моделювання *in silico* узгоджуються із експериментами *in vivo*, показуючи, що введення суспензії гадоліній-органічних нанокompatитів щурам посилює скорочення гладеньких м'язів шлунка та товстого кишечника. Органічні нанокompatити без гадолінію збільшували фазні компоненти скорочень до 283,2%, тоді як нанокompatити з гадолінієм підвищували ці скорочення до 184,9%. При цьому амплітуда тонічних компонентів залишалася незмінною.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Lanzafame AA, Christopoulos A, Mitchelson F. Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Recept Channels*. 2003;9(4):241-60. PMID: 12893537.
2. Willets JM, Mistry R, Nahorski SR, Challiss RA. Specificity of g protein-coupled receptor kinase 6-mediated phosphorylation and regulation of single-cell m3 muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Mol Pharmacol*. 2003 Nov;64(5):1059-68. doi: 10.1124/mol.64.5.1059. PMID: 14573754
3. Ibrahim MA, Hazhirkarzar B, Dublin AB. Gadolinium Magnetic Resonance Imaging. [Updated 2023 Jul 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-.
4. Jost G, Frenzel T, Boyken J, Schoeckel L, Pietsch H. Gadolinium Presence in the Brain After Administration of the Liver-Specific Gadolinium-Based Contrast Agent Gadoxetate: A Systematic Comparison to Multipurpose Agents in Rats. *Invest Radiol*. 2019 Aug;54(8):468-474
5. Clough TJ, Jiang L, Wong KL, Long NJ. Ligand design strategies to increase stability of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents. *Nat Commun*. 2019 Mar 29;10(1):1420
6. Morcos SK. Extracellular gadolinium contrast agents: differences in stability. *Eur J Radiol*. 2008 May;66(2):175-9. doi: 10.1016/j.ejrad.2008.01.025. Epub 2008 Mar 14. PMID: 18343072.
7. Kuo PH. Gadolinium-containing MRI contrast agents: important variations on a theme for NSF. *J Am Coll Radiol*. 2008 Jan;5(1):29-35. doi: 10.1016/j.jacr.2007.08.014. PMID: 18180006.

8. Ramalho M, Ramalho J, Burke LM, Semelka RC. Gadolinium Retention and Toxicity-An Update. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2017 May;24(3):138-146. doi: 10.1053/j.ackd.2017.03.004. PMID: 28501075.
9. Kallen AJ, Jhung MA, Cheng S, Hess T, Turabelidze G, Abramova L, Arduino M, Guarner J, Pollack B, Saab G, Patel PR. Gadolinium-containing magnetic resonance imaging contrast and nephrogenic systemic fibrosis: a case-control study. *Am J Kidney Dis.* 2008 Jun;51(6):966-75. doi: 10.1053/j.ajkd.2007.12.036. Epub 2008 Mar 25. PMID: 18501784.
10. Idée JM, Port M, Robic C, Medina C, Sabatou M, Corot C. Role of thermodynamic and kinetic parameters in gadolinium chelate stability. *J Magn Reson Imaging.* 2009 Dec;30(6):1249-58. doi: 10.1002/jmri.21967. PMID: 19938037.
11. Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, Green HF, Liu T, Chae PS, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Wess J, Kobilka BK. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature.* 2012 Feb 22;482(7386):552-6. doi: 10.1038/nature10867. PMID: 22358844; PMCID: PMC3529910.
12. Gautam D, Jeon J, Starost MF, Han SJ, Hamdan FF, Cui Y, Parlow AF, Gavrilova O, Szalayova I, Mezey E, Wess J. Neuronal M3 muscarinic acetylcholine receptors are essential for somatotroph proliferation and normal somatic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Apr 14;106(15):6398-403. doi: 10.1073/pnas.0900977106. Epub 2009 Mar 30. PMID: 19332789; PMCID: PMC2662962.
13. Kuznietsova, H., Géloën, A., Dziubenko, N. *et al.* In vitro and in vivo toxicity of carbon dots with different chemical compositions. *Discover Nano* 18, 111 (2023). <https://doi.org/10.1186/s11671-023-03891-9>

14. Debnath Sujit Kumar, Srivastava Rohit. Drug Delivery With Carbon-Based Nanomaterials as Versatile Nanocarriers: Progress and Prospects. 2021
15. Ferrari, M. BioMEMS and biomedical nanotechnology. In *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2007; pp. 2–17. ISBN 0387255664.
16. Tsang, S.C.; Chen, Y.K.; Harris, P.J.F.; Green, M.L.H. A simple chemical method of opening and filling carbon nanotubes. *Nature* 1994, 372, 159–162
17. Doñate-Buendia C., Torres-Mendieta R., Pyatenko A., Falomir E., Fernández-Alonso M., Mínguez-Vega G. Fabrication by laser irradiation in a continuous flow jet of carbon quantum dots for fluorescence imaging. *ACS Omega*. 2018;3:2735–2742. doi: 10.1021/acsomega.7b02082.
18. Chao-Mujica F.J., Garcia-Hernández L., Camacho-López S., Camacho-López M., Camacho-López M.A., Contreras D.R., Pérez-Rodríguez A., Peña-Caravaca J.P., Páez-Rodríguez A., Darías-Gonzalez J.G., et al. Carbon quantum dots by submerged arc discharge in water: Synthesis, characterization, and mechanism of formation. *J. Appl. Phys.* 2021;129:163301. doi: 10.1063/5.0040322.
19. <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>
20. <https://www.chemcraftprog.com/>
21. 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.].
22. C. C. J. Roothaan, “New Developments in Molecular Orbital Theory,” *Rev. Mod. Phys.*, 23 (1951) 69. DOI: 10.1103/RevModPhys.23.69
23. K. D. Dobbs and W. J. Hehre, “Molecular-orbital theory of the properties of inorganic and organometallic compounds. 6. Extended basis-sets for 2nd-row transition-metals,” *J. Comp. Chem.*, 8 (1987) 880-93. DOI: 10.1002/jcc.540080615

- 24.X. Y. Cao and M. Dolg, "Segmented contraction scheme for small-core lanthanide pseudopotential basissets," *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 581 (2002) 139-47. DOI: 10.1016/S0166-1280(01)00751-5
- 25.G. B. Bacskay, "A Quadratically Convergent Hartree-Fock (QC-SCF) Method. Application to Closed Systems," *Chem. Phys.*, 61 (1981) 385-404. DOI: 10.1016/0301-0104(81)85156-7
- 26.H. B. Schlegel and J. J. McDouall, in *Computational Advances in Organic Chemistry*, Ed. C. Ögretirand I. G. Csizmadia (Kluwer Academic, The Netherlands, 1991) 167-85. DOI: 10.1007/978-94-011-3262-6
- 27.<http://molprobit.biochem.duke.edu>
- 28.<https://opm.phar.umich.edu/proteins/1934>
- 29.Hoffmann, C., Nuber, S., Zabel, U., Ziegler, N., Winkler, C., Hein, P., Berlot, C. H., Bünemann, M., & Lohse, M. J. (2012). Comparison of the activation kinetics of the M3 acetylcholine receptor and a constitutively active mutant receptor in living cells. *Molecular pharmacology*, 82(2), 236–245. <https://doi.org/10.1124/mol.112.077578>
- 30.<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22564786/>
- 31.www.rcsb.org