

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-05>

УДК 577.352 + 636.09

ПРОТИКОРОНАВІРУСНА АКТИВНІСТЬ C₆₀ ФУЛЕРЕНУ: IN SILICO ТА IN VITRO СКРИНІНГ

В. В. Гурмач¹, В. Р. Караушу², З. С. Клестова³, В. П. Берест⁴,
Ю. І. Прилуцький²

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, вул. Академіка Заболотного, 150, м. Київ, 03143, Україна;

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, 01601, Україна;

³Інститут медичної вірусології та епідеміології вірусних захворювань, вул. Ельфріди Аульхорн, 6, 72076, Тюбінген, Німеччина;

⁴Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи 4, 61022, м. Харків, Україна

e-mail: prylut@ukr.net

Надійшла до редакції 30 грудня 2024 р. Переглянута 1 квітня 2025 р.

Прийнята до друку 6 квітня 2025 р.

Актуальність. Пошук потенційних терапевтичних засобів проти найбільш поширених коронавірусів, які несуть загрозу життю людини і тварин, є актуальним питанням сучасної біомедицини.

Мета роботи полягала в оцінці *in silico* здатності C₆₀ фулерену взаємодіяти з мембранним білком ACE2, запобігаючи утворенню комплексу «коронавірус-ACE2» і подальшому його проникненню всередину клітини-господаря, а також ефективності протикоронавірусної дії цих вуглецевих наночастинок у системах *in vitro*.

Методи. Для дослідження структурної організації білка ACE2 людини використали дані Protein Data Bank, для побудови мембрани — web-ресурс CHARMM-GUI, а для C₆₀ фулерену — онлайн сервер SwissParam. Потенційні кишені зв'язування для C₆₀ фулерену у структурі ACE2 визначили за допомогою програмного пакету Caver. Для дослідження взаємодії C₆₀ фулерену та ACE2 використали алгоритм системного молекулярного докінгу (sdock+). Розрахунки з молекулярної динаміки (МД) виконали у програмному пакеті Gromacs 2020. В експериментах *in vitro* використали цитотоксикологічні та вірусологічні методи. Статистичну обробку результатів вимірювань проводили за використання програми Statistica 13.3.

Результати. Встановили три потенційних сайти зв'язування між жолобком пептидазного домену білка ACE2 і C₆₀ фулереном. Результати молекулярного докінгу та МД свідчать, що C₆₀ фулерен утворює два стабільних комплекси з ACE2 білком, блокуючи таким чином його потенційну взаємодію з коронавірусами. За результатами *in vitro* досліджень випливає, що C₆₀ фулерени за максимально допустимої концентрації 37,5 мкг/мл діють на коронавіруси свиней (α-коронавірус) і великої рогатої худоби (β-коронавірус) на ранній стадії реплікації (1 год) у чутливих клітинних системах, суттєво знижуючи їх інфекційну активність на величину 2,00 lg ТЦД₅₀/мл і ≥2,28 lg ТЦД₅₀/мл, відповідно.

Як цитувати: Гурмач ВВ, Караушу ВР, Клестова ЗС, Берест ВП, Прилуцький ЮІ. Протикоронавірусна активність C₆₀ фулерену: *in silico* та *in vitro* скринінг. Biophysical Bulletin. 2025;53:60–71. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-05>

Citation: Hurmach VV, Karaushu VR, Klestova ZS, Berest VP, Prylutsky YuI. Anticoronavirus activity of C₆₀ fullerene: *in silico* and *in vitro* screening. Biophysical Bulletin. 2025;53:60–71. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-05> (in Ukrainian)

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Висновки. Показано, що C₆₀ фулерен утворює два стабільних комплекси з білком ACE2, пригнічуючи його функціональну активність і блокуючи потенційну взаємодію з коронавірусами. Встановлено, що C₆₀ фулерени проявляють противірусну активність щодо коронавірусів двох груп на початковій стадії інфікування при взаємодії з чутливими клітинами-господаря.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: C₆₀ фулерен; коронавіруси тварин; молекулярний докінг; молекулярна динаміка; противірусна активність *in vitro*.

Пандемія COVID-19, спричинена коронавірусом SARS-CoV-2, який відноситься до тієї ж групи вірусів, що і добре відомі патогени SARS і MERS — збудники атипової пневмонії і близькосхідної лихоманки [1, 2]. Завдяки унікальному механізму вірусної реплікації коронавіруси мають високу тенденцію до рекомбінації та частоти мутацій, що потенційно збільшує можливість їх адаптації до нових господарів та екологічних ніш. Спалахи SARS, MERS, а потім і COVID-19 стимулювали дослідження їх збудників, за результатами яких було виявлено велику кількість відповідних антивірусних мішеней, таких як вірусні протеази, полімерази та внутрішні білки коронавірусів. Вважали, що війчасті і келихоподібні епітеліальні клітини, які вкривають носову порожнину, є основними мішенями потрапляння вірусу SARS-CoV-2 в організм людини. Ці клітини, як і низка інших, містять високий рівень білків ACE2 (ангіотензин-перетворюючий фермент 2; рецепторний білок, який кодується геном *ACE2*), які сприяють зв'язуванню коронавірусу SARS-CoV-2 з поверхнею клітин [3, 4]. Білковий шип на поверхні SARS-CoV-2 здатен також прикріплюватися до білка-рецептора як клітин легені людини, так і інших чутливих до вірусу клітин, зокрема ACE2, і, таким чином, проникає всередину органу. Відтак, проблема інактивації коронавірусу потребує детального вивчення його структурної організації — складових частин, особливо тих, які беруть участь у взаємодії з клітинами-мішенями різних органів людей (у зв'язуванні та проникненні) та механізмах розмноження вірусу в клітині-мішені.

Коронавірусна інфекція великої рогатої худоби (BPX) — хвороба, яка етіологічно зумовлена дією коронавірусу BPX (Bovine coronavirus, BCoV), який, як і вірус SARS-CoV-2, належить до групи β-коронавірусів (Betacoronavirus, subgenus *Embecovirus* lineage A). BCoV — це пневмоентеральний вірус, який інфікує верхні і нижні дихальні шляхи та кишківник і виділяється з фекаліями та секретами верхніх дихальних шляхів [5]. Захворюваність у телят становить 40–100%, а летальність — 15–20% при інфікуванні [6].

Коронавіруси свиней є одними з найбільш руйнівних патогенів, що негативно впливають на розвиток свиначства у всьому світі. До них відноситься, зокрема вірус трансмісивного гастроентериту свиней (TГC; TGEV, subgenus *Tegacovirus*), що належить до групи α-коронавірусів (Alphacoronavirus). Смертність поросят до 2-тижневого віку сягає 100% [7].

За винятком філогенезу коронавірусів TГC і BPX, єдиною відомою характеристикою, що відрізняє їх між собою, є унікальний неструктурний протеїн 1 (nsr1), різний за розміром і послідовністю. Гомологія геному цих коронавірусів складає близько 54% [8]. Відтак, пошук і створення нових ефективних противірусних засобів як для людини, так і тварин, мають базуватися на моделях коронавірусів, що належать до різних груп.

Сучасні нанобіотехнології можуть бути використані для вирішення багатьох клінічних проблем, зокрема тих, що виникли внаслідок пандемії COVID-19 [9, 10]. Саме тому біосумісний [11] та біодоступний [12] C₆₀ фулерен викликає неабияку зацікавленість щодо застосування при коронавірусних інфекціях завдяки притаманній «специфічній» противірусній активності [13–17]. Так, встановлено, що ефективна доза C₆₀ фулеренів (250–1000 мкг/мл) щодо вірусу грипу типу А у 20 разів була меншою,

ніж відомого клінічного препарату римантадин [18.]. Комплекс C_{60} /полівінілпірролідон (ПВП) проявляв активність як проти ДНК, так і РНК-вірусів, зокрема проти вірусу простого герпесу (HSV-1). Після обробки вірусу грипу типу А комплексом C_{60} /ПВП морфологія вірусу змінювалася: була присутня велика кількість віріонів з порушеннями ліпідної оболонки [18.]. Автори [19] припускають, що інактивація вірусу Денге-2 при застосуванні карбоксифулерену відбувається на стадії абсорбції вірусу, внаслідок його гідрофобної взаємодії з ліпідною оболонкою вірусу. На підтвердження цим експериментальним фактам у роботі [20] *in silico* продемонстровано, що водорозчинні C_{60} фулерени утворюють пори в оболонці коронавірусу, руйнуючи її цілісність, і таким чином здатні викликати порушення відповідних стадій циклу його реплікації.

Показано, що хімічно модифікована молекула C_{60} стерично блокує ліпофільний канал протеази вірусів HIV-1 та HIV-2 [21, 22], є ефективним інгібітором полімерази NS5B та протеази NS3/4A вірусу гепатиту С [23]. Нарешті, у модельній роботі [24] продемонстрована здатність C_{60} фулерену блокувати білкові мішені 3CLpro (хімотрипсин-подібна протеаза) і RdRp (РНК-залежна РНК-полімераза) коронавірусу SARS-CoV-2 і таким чином пригнічувати його функціональну активність.

Відтак, метою цієї роботи було проведення комплексних модельних (*in silico* скринінг) та експериментальних (*in vitro* скринінг) досліджень водорозчинних C_{60} фулеренів як потенційних профілактичних/терапевтичних засобів проти найбільш поширених коронавірусів, що можуть нести загрозу життю людини і тварин. Як апатогенні для людини дослідні моделі для *in vitro* оцінювання протівірусної активності водорозчинних C_{60} фулеренів використано дві групи вірусів ТГС (α -коронавірус) і ВРХ (β -коронавірус).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для дослідження взаємодії C_{60} фулерену та ACE2 використали вбудований у QXP (швидкий пошук (Quick eXPlore)) алгоритм системного молекулярного докінгу (sdock+) [25, 26].

МД (молекулярна динаміка) розрахунки виконали у програмному пакеті Gromacs 2020 [27] та силовому полі Charmm36 [28]. МД складалася з наступних етапів: підготовка досліджуваної системи та генерування топології C_{60} фулерену за використання онлайн серверу SwissParam [29]. Для дослідження структурної організації мембранного білка ACE2 людини використали наявні дані Protein Data Bank (RCSB PDB) [30], а для побудови мембрани — web-ресурс CHARMM-GUI [31]. Потенційні кишені зв'язування для C_{60} фулерену у структурі ACE2 визначили за допомогою «cavity computational algorithm» у програмному пакеті Caver [32]. Далі проводили мінімізацію енергії системи, а потім — два етапи екваїлібрації: (1) NVT (constant Number of particles, Volume, and Temperature) і (2) NPT (constant Number of particles, Pressure, and Temperature) упродовж 20 нс. Досліджуваний комплекс протонували відповідно до імplementованої у Gromacs 2020 функції “*ingh*”. Після того як дві взаємодіючі системи були об'єднані, їх помістили у квадратний бокс і заповнили молекулами води (TIP3P). Для імітації клітинного середовища у бокс додали іони Na^+/Cl^- (їх концентрація у боксі складала 0,15 М). Основний етап МД симуляції тривав 200 нс.

Для отримання водного розчину C_{60} фулеренів (C_{60} ФВР) був застосований метод, заснований на переведенні молекул C_{60} з толуолу у воду за умов ультразвукової обробки [33]. Одержаний C_{60} ФВР за максимальної концентрації 150 мкг/мл є типовим колоїдом, що містить як поодинокі молекули C_{60} , так і їх наноагрегати [34], і залишається високостабільним упродовж 18 місяців при +4 °С.

Для досліджень коронавірусів та визначення сполук, здатних знижувати їх

інфекційну активність, важливими є умови забезпечення вимог біобезпеки. Тому для досліджень було обрано представників родини *Coronaviridae* двох груп: α -коронавірус ТГС і β -коронавірус ВРХ (до групи β -коронавірусів також відноситься і збудник COVID-19). Ці віруси тварин є апатогенними для людини модельними об'єктами і тому слугували найоптимальнішим варіантом для проведення первинних досліджень з виявлення протикоронавірусної дії C₆₀ фулерену за умов *in vitro* у лабораторії з умовами біобезпеки рівня BSL-2, наявної в Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ).

Лінії культур клітин ВНК-21 (клітини нирки золотистого хом'ячка) та НВ (клітини нирки вівці) були одержані з кріосховища Національного Центру Штамів Мікроорганізмів ДНКІБШМ (зберігання у посудинах Дюара в атмосфері азоту, -196 °C). Як поживні середовища використовували DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) та 10% розчин фетальної сироватки крові ВРХ.

Культури клітин у посівній дозі 2×10^5 клітин/мл вирощували у 96-лункових плоскодонних культуральних планшетах за температури +37 °C в атмосфері 5% CO₂. Через 24 год, коли моношар клітин був сформований, проводили заміну поживного середовища на підтримуюче безсироваткове середовище і проводили необхідні експерименти.

Через 24, 48, 72, 96, 120 і 144 годин моношар клітин досліджували в інвертованому мікроскопі DM IL LED (Leica Microsystems GmbH, ФРН) на наявність цитотоксичної дії C₆₀ фулеренів (залежно від їх концентрації у діапазоні (3,6–150) мкг/мл) за порушенням цілісності і морфології клітинного моношару (дегенерації клітин різного ступеня), появою вогнищ дегенерованих клітин (вакуолізації, зернистості, підвищеної розпластаності клітин), визначивши таким чином значення максимально допустимої концентрації (МДК) наносполуки для тестованих систем *in vitro*.

У ряди лунок культурального планшета (по 4 лунки на розведення) з моношаром культур клітин ВНК-21 та НВ вносили з 1 по 8 десятикратні розведення вірусної суспензії в об'ємі 150 мкл на лунку. Після експозиції вірусів (ТГС або ВРХ) упродовж 1, 2, 4 і 6 годин з культур клітин видаляли нанесену вірусну суспензію і вносили по 150 мкл C₆₀ВРФ за значення МДК для кожної з досліджуваних систем *in vitro*.

Противірусну активність C₆₀ фулеренів у системах *in vitro* визначали за аналізом цитопатичних ефектів за дії коронавірусів ТГС і ВРХ. Контролем для вивчення цитопатогенної дії коронавірусів слугували лунки з культурою клітин (ВНК-21 і НВ) без внесення вірусу і C₆₀ фулерену. Крім того, проводили паралельні контролю з введенням коронавірусів у культури клітин для порівняння титру їх інфекційної активності. Цитопатогенну дію коронавірусів ТГС і ВРХ та за присутності C₆₀ фулеренів оцінювали через 24, 48, 96 та 144 годин після інфікування клітинних культур ВНК-21 і НВ. Зазначимо, що тривалість експерименту обмежена тим, що за такого часу дії коронавірусів відбувалася деструкція моношару клітин у досліджуваних системах *in vitro*.

Статистичну обробку результатів вимірювань проводили методами варіаційної статистики (ANOVA) з використанням програми Statistica 13.3. При аналізі експериментальних даних у різних групах використовували t-критерій, після чого виконували множинний порівняльний тест Даннета для порівняння всіх даних з контрольними. Припущення про те, що експериментальні дані відповідають нормальному розподілу та мають ідентичні стандартні відхилення були перевірені за допомогою тестів Шапіро-Уїлка та Бартлетта, відповідно. Повторюваність вимірювань складала не менше трьох разів. Значення ймовірності справедливості нульової гіпотези $p < 0,05$ вважали достатніми для висновку про статистичну значущість відмінностей.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

In silico дослідження

Припускається, що блокування/інгібування функціональної активності досліджуваних коронавірусів може реалізовуватися через такий молекулярний механізм дії водорозчинних C_{60} фулеренів: C_{60} фулерен безпосередньо взаємодіє з поверхневим протеїном клітин господаря, зокрема ACE2, і, таким чином, запобігає утворенню комплексу «коронавірус-ACE2» і його подальшому проникненню в клітину. Виходячи з такого припущення, проведено дизайн структурної організації рецепторного білка ACE2, а також оптимально можливих комплексів між C_{60} фулереном та ACE2, оцінено їх стабільність в імітованому клітинному середовищі та внесок кожної амінокислоти у зв'язування між C_{60} фулереном і протеїном за використання методів МД і молекулярного докінгу.

Структурна організація рецепторного білка ACE2. Проаналізувавши дані Protein Data Bank (RCSB PDB), для дослідження структурної організації мембранного білка ACE2 обрали PDB структуру 6m17 (The 2019-nCoV RBD/ACE2-B0AT1 complex) [35]. Спочатку всі молекули води та природні ліганди були видалені зі структури ACE2. Потім, перед поверхневим аналізом протеїну-мішені та виявленням потенційних кишень зв'язування для C_{60} фулерену за використання програмного пакету Caver, до білку додали усі відсутні атоми гідрогену та провели корекцію протонування амідів та бічних ланцюгів відповідно до клітинного рівня рН=7. Далі провели енергетичну мінімізацію досліджуваної структури. Як результат, встановили три потенційних сайти зв'язування між жолобком PD (пептидазний домен) і C_{60} фулереном, представлені на рис. 1.

Усі сайти зв'язування характеризуються присутністю у структурі амінокислот, які здатні утворювати міцні стекінг або катіон- π взаємодії із C_{60} фулереном.

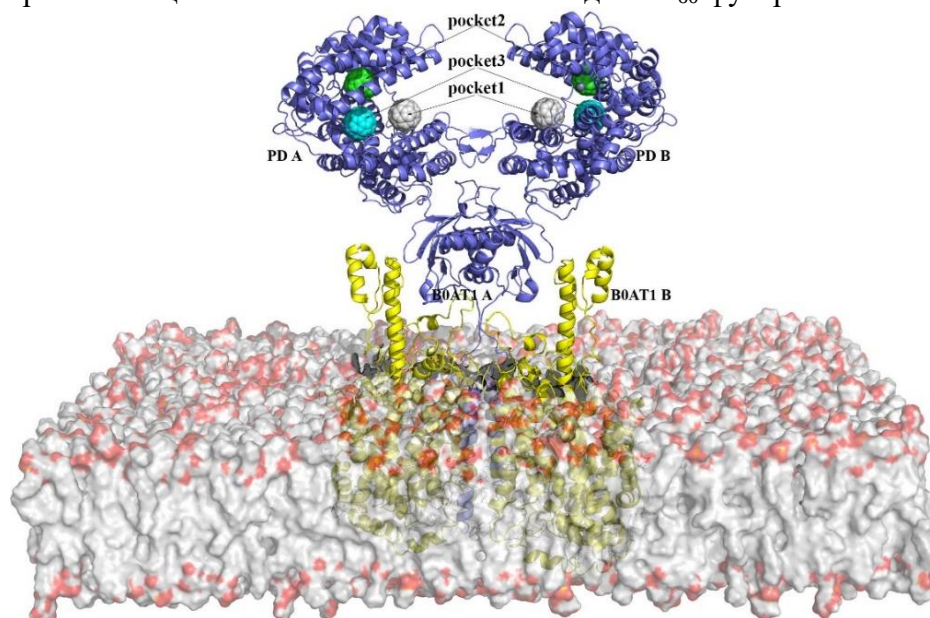


Рис. 1. Зображення вбудованого білка ACE2 у мембрану з виділеними структурними елементами та потенційними сайтами зв'язування (1, 2 і 3) для C_{60} фулерену. C_{60} фулерен показано сірим, блакитним і зеленим кольорами; мембрана — сірим, B0AT1 структура — жовтим і PD — фіолетовим кольором, відповідно.

Fig. 1. Image of the membrane-embedded ACE2 protein with highlighted structural elements and potential binding sites (1, 2 and 3) for C_{60} fullerene. C_{60} fullerene is shown in gray, blue, and green colors; membrane in gray, B0AT1 structure in yellow, and peptidase domain in purple, respectively.

Взаємодія C₆₀ фулерену з білком ACE2. Для молекулярного докінгу використали жорстку молекулу ACE2 та гнучку молекулу C₆₀. Максимальна кількість кроків розрахунку складала 300. Найкращі три «C₆₀-ACE2» комплекси, виходячи з внутрішніх скоринг-функцій QXR (контактна поверхня та оптимальна відстань між ключовими амінокислотами ACE2 і C₆₀ фулереном), відібрали для подальших досліджень.

Згідно результатів молекулярного докінгу у всіх випадках C₆₀ фулерен щільно заповнює сайти зв'язування і утримується там за рахунок різноманітних стекінг взаємодій (рис. 2А, С, Е і 3В). Так, сайт зв'язування 1 (рис. 2А) характеризується утворенням стекінг взаємодій з Phe 504, His 505, Phe 274, Tyr 127, Trp 271 та катіон-π взаємодії з Arg 273. Крім того, має місце стерична взаємодія з Asn 149.

Подібну картину спостерігали у сайті зв'язування 2 (рис. 2С): C₆₀ фулерен утворює стекінг з Trp 349 та His 401. Зазначимо, що стабільність такого комплексу потенційно є меншою за попередній варіант, оскільки тут C₆₀ фулерен затиснутий ароматичними амінокислотами лише з одного боку, що може спричинити його витіснення із сайту зв'язування.

Нарешті, сайт зв'язування 3 (рис. 2Е) відрізняється від двох попередніх тим, що тут C₆₀ фулерен є найбільш заглибленим (рис. 3В). C₆₀ фулерен утворює стекінг взаємодії з Trp 203, Tyr 510, Tyr 202 та катіон-π - з Arg 514 і Lys 562.

Важливо зазначити, що у всіх розглянутих випадках C₆₀ фулерен є затиснутим всередині кожного із сайтів зв'язування, що може стати, як причиною подальшого заглиблення C₆₀ фулерену у цей сайт (покращення зв'язування), так і причиною виштовхування C₆₀ фулерену з того чи іншого сайту зв'язування (руйнування комплексу).

Оцінку стабільності/конформаційних змін отриманих комплексів «C₆₀-ACE2» провели з використанням методу МД. Як бачимо, комплекси «C₆₀-ACE2» характеризуються значенням RMSD (Root-mean-square deviation) в межах 6 Å (рис. 3). Їх рухливість повністю корелює з рухливістю незв'язаного ACE2, винятком є лише комплекс 2, де на деяких етапах МД спостерігаються значні відхилення від інших структур (рис. 3А). Щодо C₆₀ фулерену, величина RMSD для комплексів 1 та 3 є однаковою, а для комплексу 2 — значно більшою (рис. 3В).

Загалом підчас проведення МД зафіксували такі ключові зміни у кожному з потенційних сайтів зв'язування:

1) для комплексу 1 (рис. 2В) спостерігали занурення C₆₀ фулерену у сайт зв'язування. Завдяки цьому він є затиснутий в амінокислотному середовищі та утворює такі ключові взаємодії: стекінг — з Phe 504, His 505, Phe 274, Tyr 127, Trp 271 та катіон-π — з Arg 273. Крім того, відбувається стеричне наближення Asn 149 та Gln 145, з якими існує теоретична можливість утворити міцні стеричні взаємодії. Отриманий «C₆₀-ACE2» комплекс 1 є стабільним упродовж усієї траєкторії динаміки;

2) для сайту зв'язування 2 (рис. 2D) спостерігали руйнування «C₆₀-ACE2» комплексу, оскільки C₆₀ фулерен втрачає ключові взаємодії з Trp 349 та His 401 і значно зміщується у борозні PD, після чого фіксуються стекінг взаємодії між Trp 349, His 345 та Met 62. Отже, «C₆₀-ACE2» комплекс 2 є нестабільним;

3) для комплексу 3 (рис. 2Е), як і для комплексу 1, спостерігали заглиблення C₆₀ фулерену у сайт зв'язування, внаслідок чого втрачається взаємодія з Arg 514 і Tyr 519. Але при цьому C₆₀ фулерен знаходиться глибше у сайті зв'язування та з усіх боків міцно затиснутий навколишніми амінокислотами.

Таким чином, відповідно до результатів молекулярного докінгу і МД можна зробити висновок, що C₆₀ фулерен здатний утворювати стабільні комплекси з ACE2 протеїном («C₆₀-ACE2» комплекси 1 і 3), а відтак — пригнічувати його функціональну

активність, що важливо для блокування взаємодії ACE2 з S-глікопротеїном «корони» SARS-CoV-2.

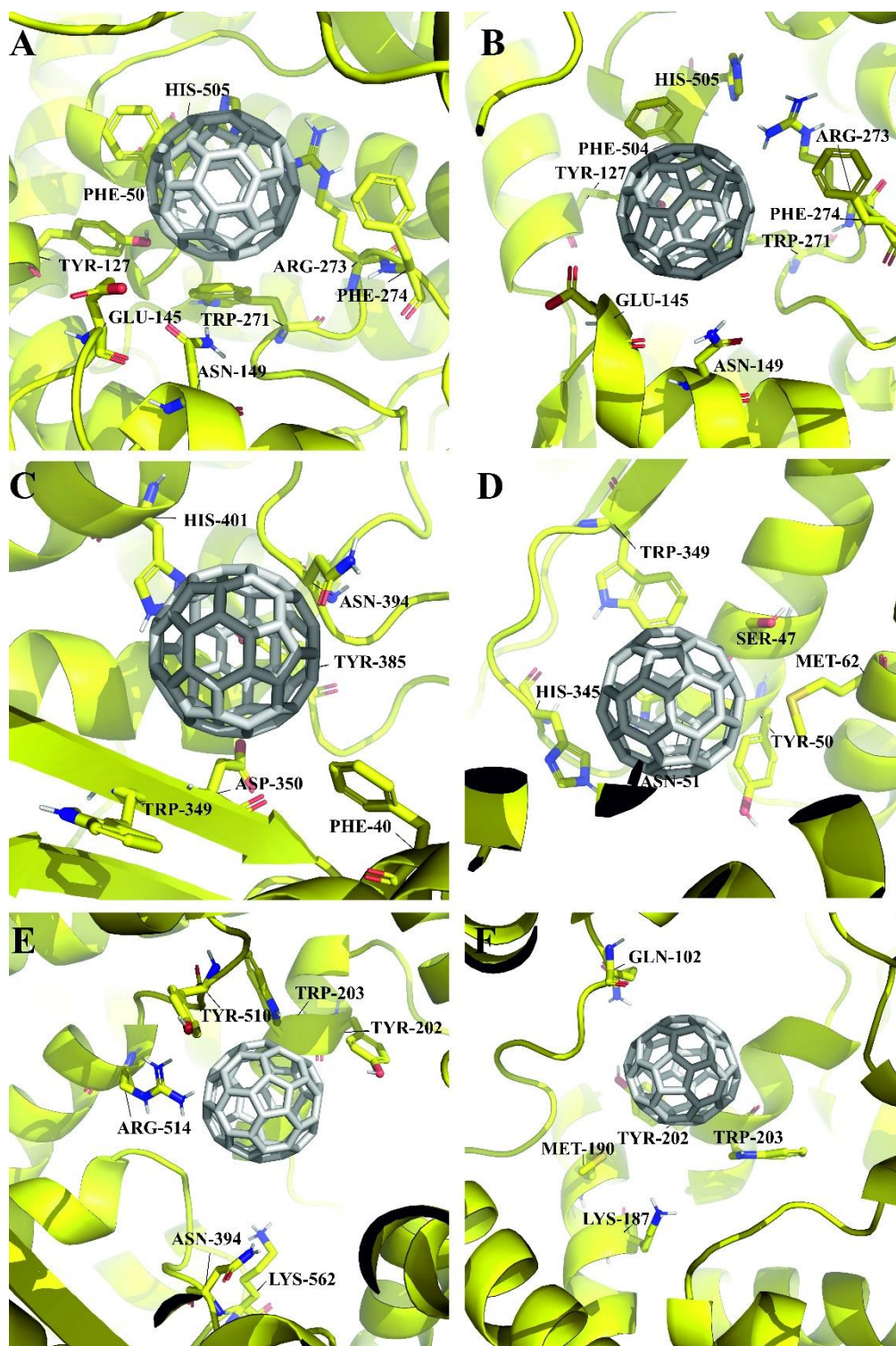


Рис. 2. Результати молекулярного докінгу (A, C, E) та МД (B, D, F): A, B — 1-й сайт зв'язування; C, D — 2-й сайт зв'язування; E, F — 3-й сайт зв'язування. У всіх випадках ACE2 — жовтий колір, C₆₀ фулерен — сірий колір.

Fig. 2. Results of molecular docking (A, C, E) and molecular dynamics (B, D, F): A, B — binding site 1; C, D — binding site 2; E, F — binding site 3. In all cases, ACE2 is yellow, C₆₀ fullerene is gray.

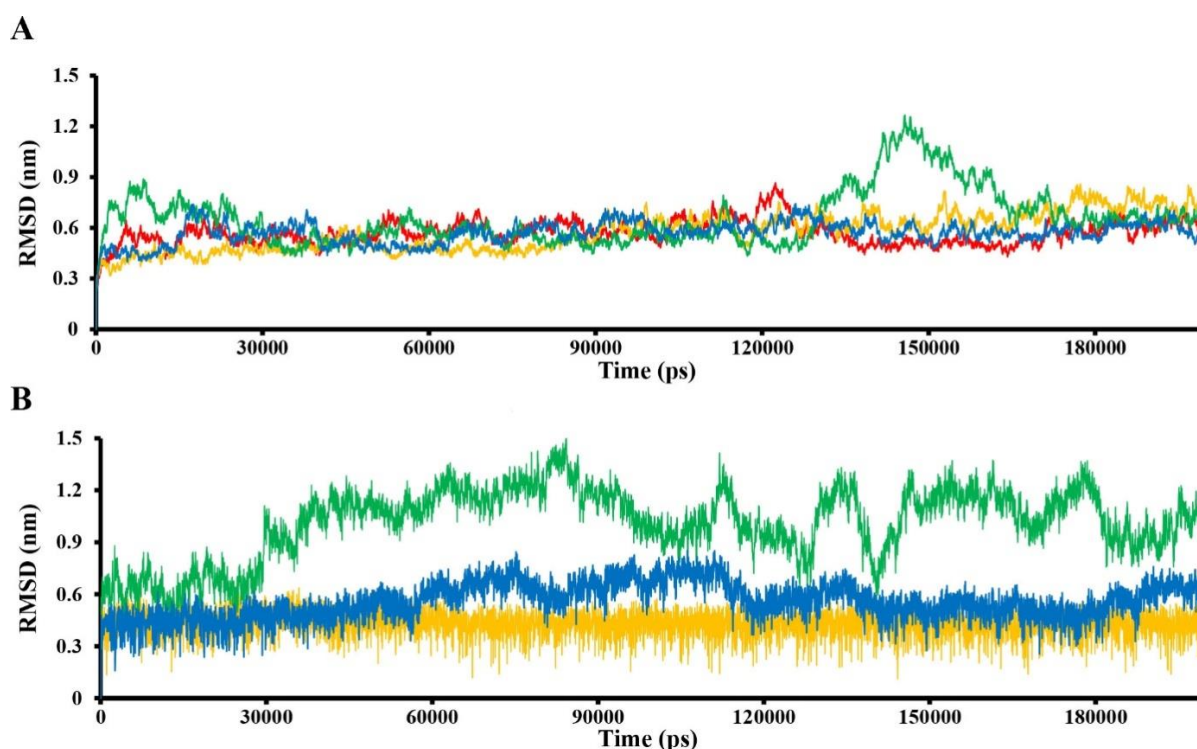


Рис. 3. Значення RMSD рухливості білка ACE2 в межах утворених «C₆₀-ACE2» комплексів (А) та C₆₀ фулерену (В): незв'язаний ACE2 — червоний колір, сайт зв'язування 1 — жовтий колір, сайт зв'язування 2 — зелений колір і сайт зв'язування 3 — синій колір.

Fig. 3. RMSD values of ACE2 protein mobility within the "C₆₀-ACE2" complexes formed (A) and single C₆₀ fullerene (B): unbound ACE2 — red color, binding site 1 — yellow color, binding site 2 — green color and binding site 3 — blue color.

Важливо зазначити, що саме використання програмного пакету Caver з великою надійністю здатне виділити потенційні кишень для зв'язування з різними лігандами [32]. У нашому випадку кожна така кишень (сайти зв'язування 1, 2 і 3) включає значну частину амінокислот, які містять ароматичну складову, що є критичним для зв'язування із C₆₀ фулереном. Крім того, рух цієї частини протеїну є важливим для зв'язування, наприклад, із SARS-CoV-2 спайк протеїном [36].

In vitro дослідження

Дослідження впливу водорозчинних C₆₀ фулеренів на різні штами коронавірусів (моделі, дані з яких можна екстраполювати до умов пандемічних штамів коронавірусів людини) є актуальним саме через циркулювання на цей момент у світі різних штамів коронавірусу людини, збудника COVID-19, який швидко мутує і представляє загрозу при зміні своїх властивостей навіть для імунних до перших штамів коронавірусу людей. Тому ми зосередилися на *in vitro* тестуванні інгібування інфекційних властивостей (реплікації) коронавірусів двох груп, збудників ТГС і ВРХ, за дії водорозчинних C₆₀ фулеренів.

Спочатку було протестовано широкий діапазон концентрацій C₆₀ФВР для визначення величини МДК для досліджуваних систем *in vitro*. Встановлено, що величина МДК у культурі клітин ВНК-21 і НВ склала 37,50±0,03 мкг/мл. Тест на цитотоксичність засвідчив, що водорозчинні C₆₀ фулерени не впливали на морфологію досліджуваних клітин, отриманих з різних видів тварин, за цієї концентрації.

Зазначимо, що визначення величини МДК у культурі клітин, як показника цитотоксичності противірусної сполуки, є важливим, оскільки дає можливість з'ясувати, чи не переважає токсичний ефект досліджуваної сполуки на клітини її антивірусну активність, тобто, чи можливо використовувати цю сполуку у подальшому як лікарський противірусний засіб.

Важливо зауважити, що згідно з попередніми результатами [37, 38] водорозчинні C_{60} фулерени у концентраціях до 24 та 144 мкг/мл не виявляли жодних токсичних ефектів ні у мезенхімальних стовбурових клітинах людини, ні у клітинах ембріональної нирки людини (НЕК293).

Застосування C_{60} ФВР у культурі клітин ВНК-21 за встановленого значення МДК через 1 год після інфікування клітинного моношару коронавірусом ТГС, адаптованого до клітин ВНК-21, знижувало титр його інфекційної активності на величину $2,00 \pm 0,02 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$.

Застосування C_{60} ФВР у культурі клітин НВ за встановленого значення МДК через 1 год після інфікування коронавірусом ВРХ, адаптованого до клітин НВ, знижувало титр його інфекційної активності на величину $\geq 2,28 \pm 0,02 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$.

Нарешті, при застосуванні C_{60} ФВР у культурах клітин ВНК-21 і НВ за встановленого значення МДК понад 1 год після інфікування відповідних клітинних моношарів коронавірусами ТГС і ВРХ, відповідно, достовірного противірусного ефекту не виявлено.

Одержані результати добре узгоджуються з даними [20], де показано що застосування C_{60} ФВР за відповідного значення МДК в системі *in ovo* демонструє противірусну активність щодо коронавірусу інфекційного бронхіту курей на ранніх стадіях взаємодії з чутливими клітинами (1–4 год).

ВИСНОВКИ

За результатами проведеного молекулярного докінгу та МД впливає, що C_{60} фулерен утворює принаймні два стабільних комплекси з АСЕ2 протеїном, пригнічуючи таким чином його функціональну активність і блокуючи потенційну взаємодію з коронавірусами.

За результатами проведених *in vitro* досліджень впливає, що водорозчинні C_{60} фулерени діють на коронавіруси двох груп, збудників ТГС і ВРХ, на ранній стадії реплікації (1 год) у чутливих клітинних системах, ВНК-21 і НВ, суттєво знижуючи їх інфекційну активність: на величину $2,00 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ і $\geq 2,28 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, відповідно. Це вказує на перспективу використання водорозчинних C_{60} фулеренів як потенційних протикоронавірусних наноагентів, здатних інгібувати реплікацію ДНК- і РНК-вмісних вірусів на початковій стадії інфікування при взаємодії з чутливими клітинами-господаря.

ПОДЯКА

Автори вдячні Dr. K. Hopfensperger (*Institute for Medical Virology and Epidemiology of Viral Diseases, Tübingen, Germany*) за допомогу у порівняльному аналізі вірусів ТГС та ВРХ.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

В. В. Гурмач  <https://orcid.org/0000-0002-0844-1586>

В. Р. Караушу  <https://orcid.org/0009-0007-9979-0020>

З. С. Клестова  <https://orcid.org/0000-0003-0771-7808>
 В. П. Берест  <https://orcid.org/0000-0001-7779-154X>
 Ю. І. Прилуцький  <https://orcid.org/0000-0002-9847-4137>

REFERENCES

1. Song Z, Xu Y, Bao L, Zhang L, Yu P, Qu Y, Zhu H, et al. From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses*. 2019;11(1):59. <https://doi.org/10.3390/v11010059>
2. Lai C-C, Shih T-P, Ko W-C, Tang H-J, Hsueh P-R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;55(3):105924. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105924>
3. Fung TS, Liu DX. Human coronavirus: host-pathogen interaction. *Annual Rev Microbiol*. 2019;73:529–57. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759>
4. Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, et al. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*. 2020;181(4):894–904. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.045>
5. Saif LJ, Jung K. Comparative pathogenesis of bovine and porcine respiratory coronaviruses in the animal host species and SARS-CoV-2 in humans. *J Clin Microbiol*. 2020;58(8):e01355–20. <https://doi.org/10.1128/jcm.01355-20>
6. Urie NJ, Lombard JE, Shivley CB, Kopral CA, Adams AE, Earleywine TJ, et al. Prewaned heifer management on US dairy operations: Part V. Factors associated with morbidity and mortality in preweaned dairy heifer calves. *J Dairy Sci*. 2018;101(10):9229–44. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14019>
7. Saif LJ, Wesley R. Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory Coronavirus. In: *Diseases of Swine*. Iowa State Univ Press, 1999:295–325.
8. Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen K-Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*. 2010;2(8):1804–20. <https://doi.org/10.3390/v2081803>
9. Nikaeen G, Abbaszadeh S, Yousefinejad S. Application of nanomaterials in treatment, anti-infection and detection of coronaviruses. *Nanomedicine (Lond.)*. 2020;15(15):1501–12. <https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0117>
10. Innocenzi P, Stagi L. Carbon-based antiviral nanomaterials: graphene, C-dots, and fullerenes. A perspective. *Chem Sci*. 2020;11(26):6606–22. <https://doi.org/10.1039/D0SC02658A>
11. Halenova T, Raksha N, Savchuk O, Ostapchenko L, Prylutskyi YuI, Ritter U, et al. Evaluation of the biocompatibility of water-soluble pristine C₆₀ fullerenes in rabbit. *BioNanoSci*. 2020;10:721–30. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00762-w>
12. Mchedlov-Petrosyan NO. Fullerenes in liquid media: an unsettling intrusion into the solution chemistry. *Chem Rev*. 2013;113(7):5149–93. <https://doi.org/10.1021/cr3005026>
13. Shoji M, Takahashi E, Hatakeyama D, Iwai Y, Morita Y, Shirayama R, et al. Anti-influenza activity of C₆₀ fullerene derivatives. *PLoS One*. 2013;8(6):e66337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066337>
14. Dechant PP, Wardman J, Keef T, Twarock R. Viruses and fullerenes - symmetry as a common thread? *Acta Crystallogr A Found Adv*. 2014;70(2):162–7. <https://doi.org/10.1107/S2053273313034220>
15. Goodarzi S, Da Ros T, Conde J, Sefat F, Mozafari M. Fullerene: biomedical engineers get to revisit an old friend. *Mater Today*. 2017;20(8):460–80. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.03.017>
16. Moussa F. Fullerene and derivatives for biomedical applications. *Nanobiomater*. 2018;113–36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100716-7.00005-2>
17. Kraevaya OA, Peregodov AS, Godovikov IA, Shchurik EV, Martynenko VM, Shestakov AF, et al. Direct arylation of C₆₀Cl₆ and C₇₀Cl₈ with carboxylic acids: a synthetic avenue to water-soluble fullerene derivatives with promising antiviral activity. *Chem Commun (Camb)*. 2020;56(8):1179–82. <https://doi.org/10.1039/c9cc08400b>
18. Piotrovsky LB, Kiselev OI. Fullerenes and viruses. *Fuller, Nanotub Car N*. 2006;12(1–2):397–403. <https://doi.org/10.1081/fst-120027198>
19. Lin YL, Lei HY, Wen YY, Luh T, Chou CK, Liu HS. Light-independent inactivation of Dengue-2 virus by carboxyfullerene C₃ isomer. *Virology*. 2000;275(2):258–62. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0490>
20. Hurmach V, Karaushu V, Klestova Z, Berest V, Prylutskyi Y. C₆₀ fullerene nanoparticles permeability through the model lipid envelope of coronavirus and their anticoronavirus effect in the *in ovo* system. *Biophysical Bulletin*. 2023;(50):17–24. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-50-02>
21. Sijbesma R, Srdanov G, Wudl F, Castoro JA, Wilkins C, Friedman CH, et al. Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes. *J Am Chem Soc*. 1993;115(15):6510–12. <https://doi.org/10.1021/ja00068a006>
22. Marchesan S, Da Ros T, Spalluto G, Balzarini J, Prato M. Anti-HIV properties of cationic fullerene derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005;15(15):3615–18. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.05.069>

23. Kataoka H, Ohe T, Takahashi K, Nakamura S, Mashino T. Novel fullerene derivatives as dual inhibitors of Hepatitis C virus NS5B polymerase and NS3/4A protease. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26(19):4565–7. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.08.086>
24. Hurmach VV, Platonov MO, Prylutska SV, Scharff P, Prylutsky YuI, Ritter U. C₆₀ fullerene against SARS-CoV-2 coronavirus: an *in silico* insight. *Sci Rep*. 2021;11(1):17748. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97268-6>
25. McMartin C, Bohacek RS. QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. *J Comput Aided Mol Des*. 1997;11(4):333–44. <https://doi.org/10.1023/a:1007907728892>
26. Warren GL, Andrews CW, Capelli A-M, Clarke B, LaLonde J, Lambert MH, et al. A critical assessment of docking programs and scoring functions. *J Med Chem*. 2006;49(20):5912–31. <https://doi.org/10.1021/jm050362n>
27. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftWareX*. 2015;1–2:19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
28. Huang J, MacKerell Jr AD. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem*. 2013;34(25):2135–45. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
29. Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *J Comput Chem*. 2011;32(11):2359–68. <https://doi.org/10.1002/jcc.21816>
30. RCSB Protein Data Bank [Internet]. The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank [cited 2024 Nov 5]. Available from: <https://www.rcsb.org/>
31. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem*. 2008;29:1859–65. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
32. Jurcik A, Bednar D, Byska J, Marques SM, Furmanova K, Daniel L, et al. CAVER Analyst 2.0: Analysis and Visualization of Channels and Tunnels in Protein Structures and Molecular Dynamics Trajectories. *Bioinformatics*. 2018;34(20):3586–88. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty386>
33. Ritter U, Prylutsky YuI, Evstigneev MP, Davidenko NA, Cherepanov VV, Senenko AI, et al. Structural features of highly stable reproducible C₆₀ fullerene aqueous colloid solution probed by various techniques. *Fuller Nanotub Car N*. 2015;23(6):530–4. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2013.870900>
34. Prilutski Yu, Durov S, Bulavin L, Pogorelov V, Astashkin Yu, Yashchuk V, et al. Study of structure of colloidal particles of fullerenes in water solution. *Mol Cryst Liq Cryst*. 1998;324:65–70. <https://doi.org/10.1080/10587259808047135>
35. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*. 2020;367(6485):1444–8. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>
36. Shang J, Ye G, Shi K., Wan Y, Luo C, Aihara H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*. 2020;581:221–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>
37. Tolkachov M, Sokolova V, Korolovych V, Prylutsky Yu, Eppe M, Ritter U, et al. Study of biocompatibility effect of nanocarbon particles on various cell types *in vitro*. *Mat-wiss u Werkstofftech*. 2016;47(2–3):216–21. <https://doi.org/10.1002/mawe.201600486>
38. Prylutska SV, Grebinyk AG, Lynchak OV, Byelinska IV, Cherepanov VV, Tauscher E, et al. *In vitro* and *in vivo* toxicity of pristine C₆₀ fullerene aqueous colloid solution. *Fuller Nanotub Car N*. 2019;27(9):715–28. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2019.1634055>

ANTICORONAVIRUS ACTIVITY OF C₆₀ FULLERENE: IN SILICO AND IN VITRO SCREENING

V. V. Hurmach¹, V. R. Karaushu², Z. S. Klestova³, V.P. Berest⁴,
Yu. I. Prylutsky²

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, NASU, 150 Zabolotnogo Str., Kyiv, 03143, Ukraine;

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, ESC "Institute of Biology and Medicine", 64/13 Volodymyrska Str., Kyiv, 01601, Ukraine;

³The Institute for Medical Virology and Epidemiology of Viral Diseases, Elfriede-Aulhorn-Straße 6, 72076 Tübingen, Germany;

⁴V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine
e-mail: prylut@ukr.net

Submitted December 25, 2024; Revised April 1, 2025;

Accepted April 6, 2025

Background: The search for potential therapeutic agents against the most common coronaviruses, which can pose a threat to human and animal life, is an urgent issue of modern biomedicine.

Objective of the work was to evaluate *in silico* the ability of C₆₀ fullerene to interact with the membrane protein ACE2, thereby preventing the formation of the "coronavirus-ACE2" complex and its further penetration into the host cell, as well as the effectiveness of the anticoronavirus action of these carbon nanoparticles in *in vitro* systems.

Methods: The Protein Data Bank was used to study the structural organization of the human ACE2 membrane protein. The CHARMM-GUI and SwissParam web resources were used to construct the membrane and C₆₀ fullerene, respectively. Potential binding pockets for C₆₀ fullerene in the ACE2 structure were determined using the Caver software package. The system molecular docking algorithm (sdock+) was used to study the interaction between C₆₀ fullerene and ACE2. Molecular dynamics (MD) calculations were performed using the Gromacs 2020 software package. Cytotoxicological and virological methods were used in *in vitro* experiments. Statistical processing of experimental results was carried out using the Statistica 13.3 program.

Results: It was found three potential binding sites between the groove of the peptidase domain of the ACE2 protein and C₆₀ fullerene. According to the results of molecular docking and MD, it follows that C₆₀ fullerene forms two stable complexes with the ACE2 protein, thus blocking its potential interaction with coronaviruses. According to the results of *in vitro* studies, it follows that C₆₀ fullerenes at a maximum allowable concentration of 37.5 µg/ml act on the coronaviruses of swine (α-coronavirus) and cattle (β-coronavirus) at the early stage of replication (1 h) in sensitive cellular systems, significantly reducing their infectious activity by 2.00 TCID₅₀/ml and ≥2,28 TCID₅₀/ml, respectively.

Conclusions: C₆₀ fullerene has been shown to form two stable complexes with the membrane protein ACE2, thereby inhibiting its functional activity and blocking potential interaction with coronaviruses. It was established that the C₆₀ fullerenes show antiviral activity against coronaviruses of two groups at the initial stage of infection when interacting with sensitive host cells.

KEY WORDS: C₆₀ fullerene; animal coronaviruses; molecular docking; molecular dynamics; antiviral activity *in vitro*.