

Особенности электростатического взаимодействия метиленового синего с белковой оболочкой флавивирусов

**Васюченко Е.П.^{*1}, Страховская М.Г.^{1,2}, Коваленко И.Б.¹,
Фурсова П.В.¹, Рубин А.Б.¹**

¹*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

²*Научно-образовательный математический центр «Северо-Западный центр
математических исследований имени Софьи Ковалевской», Псковский
государственный университет, Псков, Россия*

Аннотация. Среди многих фармакологических свойств метиленового синего хорошо известна его противовирусная активность в отношении оболочечных вирусов, включая флавивирусы. Флавивирусы представляют глобальную угрозу для здоровья человека. К этой группе вирусов относятся в том числе вирус Зика, вызывающий серьезные нарушения развития при внутриутробном инфицировании, и вирус денге, на который приходится существенная доля всех случаев заболеваний, вызываемых флавивирусами. В настоящей работе мы создали полную карту контактов метиленового синего с белковой оболочкой двух флавивирусов. Впервые методом броуновской динамики проанализированы контакты метиленового синего с аминокислотными остатками белков оболочки вируса Зика и вируса денге, которые вовлечены в ранние стадии инфицирования клеток, и выявлены контакты, которые могут определять известную противовирусную активность этого соединения. Обнаружено, что обширная область отрицательного потенциала, окружающая гликановую петлю белка оболочки вируса Зика эффективно притягивает молекулы метиленового синего, в то время как гликановая петля вируса денге закрыта от электростатических взаимодействий с молекулой метиленового синего областью положительного потенциала. В свою очередь, петля белка оболочки вируса денге, опосредующая первичное связывание вирусов с клетками, способна образовывать значительное количество контактов с молекулами метиленового синего, чего не наблюдается для аналогичной петли в белке оболочки вируса Зика. Методы молекулярного моделирования позволили нам теоретически обосновать известное из экспериментальных исследований ингибирующее влияние метиленового синего на первые стадии жизненного цикла оболочечных вирусов, включающие первичное узнавание поверхности клетки-хозяина и слияние мембран.

Ключевые слова: *флавивирусы, вирус Зика, вирус денге, белок оболочки, метиленовый синий, броуновская динамика, компьютерное моделирование*

ВВЕДЕНИЕ

В 2026 году исполнится 150 лет, как немецким химиком Генрихом Каро был впервые синтезирован метиленовый синий (МС) – производное фенотиазина с замечательными свойствами, широко применяющееся человечеством в самых различных областях, таких как легкая промышленность, аналитическая химия и

^{*}vasyuchenko.katya@gmail.com

биохимия, микробиология и медицина. МС является первым полностью синтетическим соединением, используемым в качестве лекарственного препарата. МС сыграл значительную роль в борьбе с малярией и в настоящее время применяется в качестве антидота при метгемоглобинемии, в качестве антисептика при инфекциях кожи и слизистых [1], а также служит для фотодинамического обеззараживания препаратов крови в системе THERAFLEX MB-Plasma [2]. В плазме крови МС в комбинации с видимым светом способен инактивировать широкий круг вирусов, включая вирусы Зика, желтой лихорадки, денге, чикунгуньи, Эбола и коронавирус ближневосточного респираторного синдрома [3]. Однако инактивирующее действие МС на вирусы не ограничивается фотодинамическими процессами и может осуществляться без фотоактивации. Так, обработка МС в микромолярных концентрациях вызывает снижение титров коронавируса в культурах клеток [4]. Предполагается, что в этом случае МС действует как ингибитор взаимодействия между S белком шипа коронавируса и его клеточным рецептором ACE2 [5], предотвращая связывание коронавирусов с клеткой и слияние мембран. В пользу этого свидетельствует обнаруженная нами в молекулярной модели преимущественная локализация молекул МС именно на S белках коронавируса SARS-CoV-2, в том числе в области рецептор-связывающего домена [6]. Интересно, что МС обладает свойством не только ингибировать внеклеточные формы коронавирусов, но и действовать внутри зараженных клеток. При этом фармакологической мишенью МС могут являться виропорины, вирусные каналы белки, которые экспрессируются в мембранах компартмента ERGIC зараженных клеток и участвуют в формировании новых вирусных частиц [7]. С помощью методов компьютерного моделирования мы показали, что отрицательно заряженные аминокислотные остатки глутаминовой кислоты на входе в канал виропорина эффективно связывают МС за счет электростатических взаимодействий. При погружении в канал МС вступает во множественные нековалентные π -взаимодействия, причем глобальный минимум энергии достигается за счет многочисленных π - π взаимодействий МС с остатками фенилаланина в центре канала [8]. Такие взаимодействия могут приводить к блокировке проводимости канала и ингибированию его функций.

К настоящему времени известно более 70 флавивирусов, многие из которых вызывают опасные заболевания, среди них быстро распространяющийся вирус Зика (ZIKV) и вирус денге (DENV) – возбудитель одноименной лихорадки у 400 миллионов человек в год. Как и другие оболочечные вирусы, ZIKV и DENV чувствительны к обработке МС. Несмотря на то, что облучение видимым светом в процессе фотодинамической инактивации усиливает вирулицидные свойства МС в отношении флавивирусов, они проявляются в определенной степени и в отсутствие освещения. При этом МС значительно снижает инфекционность ZIKV и, в меньшей степени, DENV в культурах клеток, как при предварительной обработке, так и на поздних стадиях жизненного цикла вирусов [9].

Небольшие сферические вирионы флавивирусов с диаметром около 50 нм имеют строение, типичное для оболочечных вирусов. Геномная РНК окружена множественными копиями белка С, образуя нуклеокапсидное ядро, которое, в свою очередь, окружено липидным бислоем, полученным из клетки-хозяина, и внешней гликопротеиновой оболочкой. У флавивирусов внешняя оболочка имеет икосаэдрическую симметрию и построена из 180 копий гликопротеинов М и Е. Последние организованы в 30 рафтов, каждый из которых состоит из трех димеров белка Е. Белок Е играет важную роль в процессах репликации и созревания вируса, участвует в узнавании клетки-хозяина, связывании с рецептором, слиянии мембран и сборке вируса [10].

Электростатические взаимодействия играют важную роль в жизненном цикле флавивирусов, в том числе в процессах первичного узнавания клетки-хозяина [11]. В

настоящей работе мы применили подход броуновской динамики для анализа взаимодействий МС с белковой оболочкой двух флавивирусов, вируса Зика и вируса денге, построили карты электростатических контактов молекул МС с аминокислотными остатками белков оболочек флавивирусов и выявили конкретные аминокислотные остатки Е белков, образующие контакты с МС и играющие важную роль на ранних стадиях инфицирования клеток.

МЕТОДЫ

Создание белковых оболочек вируса Зика и вируса денге

Модели белковых оболочек созданы на основе структур из базы данных PDB, идентификаторы 5IRE (ZIKV) и 3J6S (DENV) [12, 13]. Эти структуры содержат повторяющийся мотив белковой оболочки, состоящий из трех Е белков и трех М (мембранных) белков, а также информацию о положении и ориентации такого повторяющегося мотива в оболочке вириона. Недостающие аминокислотные остатки и боковые цепи были добавлены в структуру повторяющегося мотива с помощью программы PDBFixer [14]. Парциальные заряды на атомах были рассчитаны в соответствии с силовым полем AMBER99SB [15]. Энергия системы была минимизирована методом наискорейшего спуска. На основе повторяющихся мотивов были собраны белковые оболочки вирионов ZIKV и DENV (рис. 1). Е белок вируса Зика несет общий заряд -4 , вируса денге – заряд $+1$.

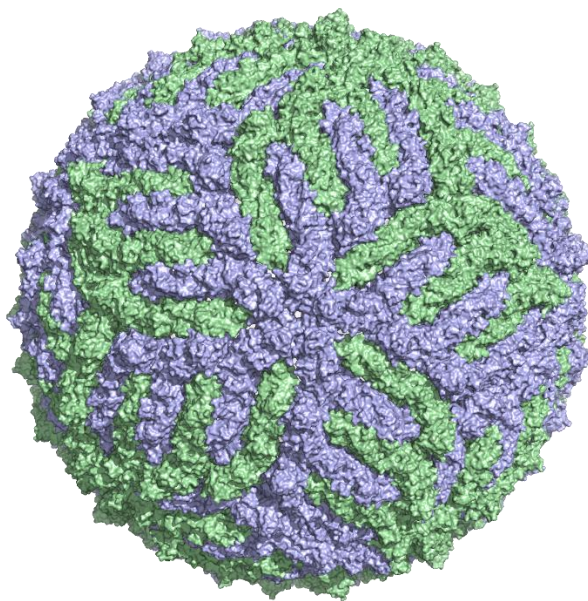


Рис. 1. Структура внешней белковой оболочки флавивирусов, состоящая из 180 копий Е белков, организованных в 30 рафтов по три параллельных димера. Два Е белка в димере окрашены в сиреневый и светло-зеленый цвета.

Модель молекулы МС была создана нами и описана в работе [7]. Молекула МС была заряжена положительно, а ее единичный заряд был распределен на двух диметиламиновых группах в соответствии с [16].

Броуновская динамика

Диффузия молекул метиленового синего и их электростатические взаимодействия с белковыми оболочками флавивирусов были исследованы методом броуновской динамики, реализованным в программе ProKSim [17]. Мы рассматриваем взаимодействие подвижной молекулы МС с жёсткой неподвижной вирусной оболочкой в растворе как многостадийный процесс, включающий свободную диффузию молекулы МС в растворе, её случайное сближение и пространственную ориентацию, а также

дальнейшее сближение противоположно заряженных областей за счёт дальнедействующих электростатических взаимодействий. В броуновской динамике молекула МС рассматривается как броуновская частица, совершающая поступательные и вращательные движения в вязкой среде под действием случайной силы, возникающей при её соударении со средой, и электростатических сил. Для математического описания процесса броуновского движения используется уравнение Ланжевена, которое определяет изменение каждой координаты со временем под действием случайных и внешних сил [17].

Уравнение Пуассона – Больцмана [17] использовалось для расчёта поля электростатического потенциала как для вирионов ZIKV и DENV, так и для молекулы МС. Белковая оболочка вирионов представлялась как область с диэлектрической проницаемостью $\epsilon = 2$ с фиксированными парциальными зарядами. Использовался неявный растворитель с диэлектрической проницаемостью $\epsilon = 80$ и ионной силой 100 мМ. Электростатические взаимодействия учитывались между заряженными частицами, расположенными ближе 3.5 нм друг от друга. В моделировании броуновской динамики исследуемый вирион помещался в центр кубического реакционного объема с размером грани 200 нм с периодическими граничными условиями. При каждом запуске броуновской динамики молекула МС случайным образом располагалась в объеме, не занимаемом вирионом, и в дальнейшем совершала движение под действием электростатической и случайной сил. Моделирование продолжалось до тех пор, пока энергия электростатического притяжения между молекулой МС и вирионом не достигала заранее определенного порогового значения 3 кТ. Конечное положение МС относительно вириона регистрировалось для последующего анализа, и затем рассчитывалась следующая траектория броуновской динамики. Всего было получено около 38500 электростатических комплексов МС с вирионом ZIKV и 29000 с вирионом DENV.

Мы считали, что молекула МС образует контакт с аминокислотным остатком Е белка флавивирусов, если молекула МС приближается к любому атому этого аминокислотного остатка на расстояние 0.6 нм. Для каждого аминокислотного остатка Е белка контакты с МС были просуммированы по всем Е белкам оболочки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все патогенные флавивирусы используют гликозаминогликаны (ГАГ), присутствующие на поверхности клетки-хозяина, в качестве факторов прикрепления [18]. В Е белке оболочки флавивирусов обычно выделяют три домена (DI, DII, DIII). ГАГ-связывающая петля соответствует аминокислотным остаткам LYS290–LYS316 (ZIKV) и LYS282–LYS308 (DENV) и находится на границе доменов DI и DIII. Эта область богата положительно заряженными остатками лизинов, что, по всей видимости, способствует электростатическим взаимодействиям ГАГ-связывающей петли с отрицательно заряженными сульфатированными ГАГ. В домене DI находится участок полипептидной цепи, который называют «гликановая петля». Этот участок включает аминокислотные остатки HIS144–ASN163 у вируса Зика и HIS144–GLN156 у вируса денге. Остатки ASP154 и ASP153 представляют сайт гликозилирования у вирусов Зика и денге, соответственно [19, 20].

В данной работе были проведены расчеты броуновской динамики взаимодействия молекул МС с белковой оболочкой флавивирусов ZIKV и DENV и получены 38500 и 29000 электростатических комплексов с энергией электростатического притяжения 3 кТ, соответственно. Места электростатических контактов молекул МС на поверхности оболочки вирионов образуют обособленные области (рис. 2). Наиболее характерные области притяжения молекул МС располагаются у вируса Зика на границе доменов DI и DIII в местах контактов трех мономеров Е белка (на границе синих и оранжевых областей), а в случае вируса денге – места схождения трех мономеров Е

белка (оранжевые области) и пяти мономеров Е белка (синие области). Также на поверхности обоих вирусов присутствуют области контактов с молекулами МС на домене DII.

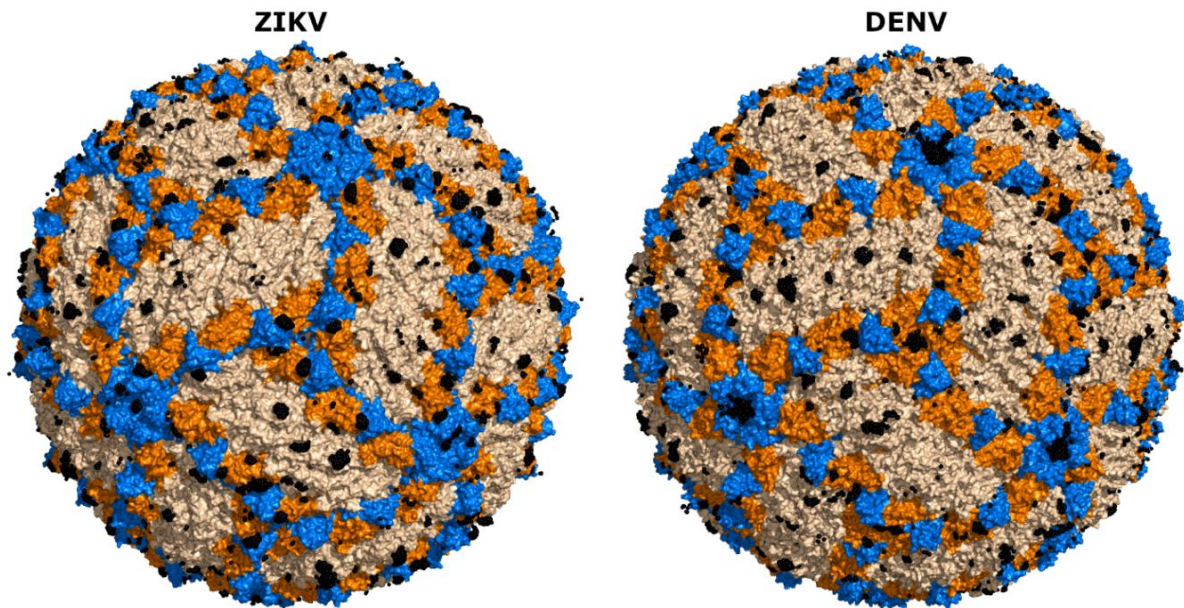


Рис. 2. Электростатические комплексы молекул метиленового синего с белковой оболочкой вируса Зика (слева) и вируса денге (справа). Центры масс молекул метиленового синего (МС) представлены черными сферами. Поверхность белковой оболочки вирусов окрашена в соответствии с доменной организацией Е белка (домен I – оранжевый, домен II – бежевый, домен III – синий).

Результаты анализа контактов молекул МС с аминокислотными остатками Е белков вирусов Зика и денге приведены на рисунке 3. Видно, что в области гликановой петли домена DI Е белка вируса Зика присутствуют многочисленные контакты МС с шестью аминокислотными остатками, а именно SER146, GLN147, HIS148, MET151, ASP161, GLU162. Также обращают на себя внимание многочисленные контакты МС с расположенными в домене DIII остатками THR366 и GLU367, и с участками GLU71–GLU87 и GLU230–THR233 в домене DII. Заметим, что на участке, содержащем ГАГ-петлю и ответственном за первичное узнавание клетки-хозяина (аминокислотные остатки LYS290–LYS316), контакты с МС малочисленны.

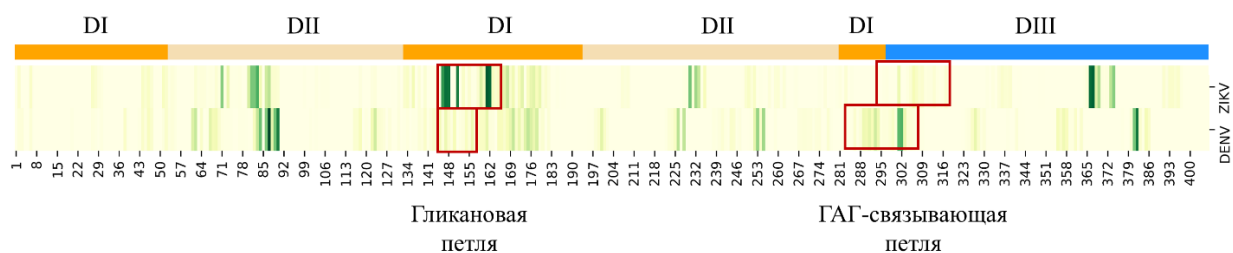


Рис. 3. Аминокислотные остатки в первичных последовательностях вируса Зика (ZIKV) и вируса денге (DENV), окрашенные от светло-желтого до темно-зеленого в зависимости от относительного количества контактов с МС. Полоса сверху показывает доменную организацию Е белка (в соответствии с окраской на рис. 2). Красными рамками обозначены участки Е белка, соответствующие гликановой петле (остатки 144–163 для вируса Зика и 144–156 для вируса денге), и участки, соответствующие ГАГ-связывающей петле (остатки 290–316 для вируса Зика и 282–308 для вируса денге).

С областью гликановой петли домена DI Е белка вируса денге молекулы МС, напротив, контактируют слабо. Наибольшее число контактов наблюдается в домене DII

на участке LEU82–TYR90, содержащем три отрицательно заряженных аминокислотных остатка GLU84, GLU85 и ASP87. В отличие от Е белка вируса Зика, в области ГАГ-связывающей петли Е белка вируса денге имеются многочисленные контакты МС с аминокислотными остатками THR301 и ASN302, а также с GLY381 и ASP382 в домене DIII.

Вторичная структура Е белка вируса Зика организована так, что гликановая петля, содержащая отрицательно заряженные аминокислотными остатками ASP155, GLU159, ASP161 и GLU162, дополнительно окружена отрицательно заряженными остатками ASP42, GLU44, GLU329, ASP336, GLU367, GLU370, GLU377 (рис. 4). Заметим, что остатки домена DIII THR366 и GLU367 имеют большое количество контактов с молекулами МС (рис. 3). Таким образом, все перечисленные аминокислотные остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот формируют обширную область отрицательного потенциала в области гликановой петли, электростатически притягивающую положительно заряженные молекулы МС.

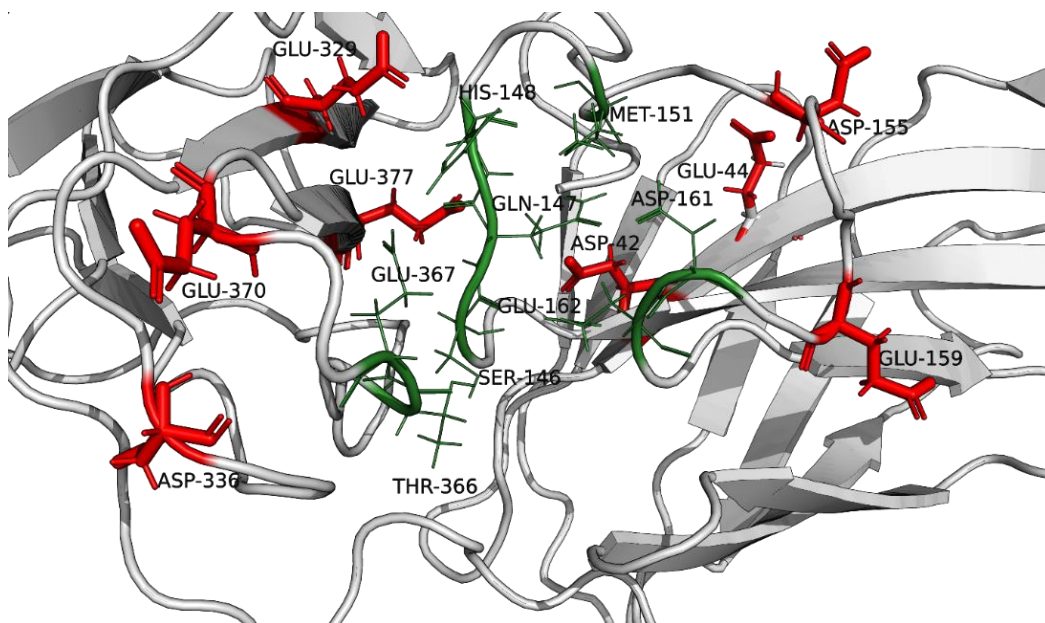


Рис. 4. Участок Е белка вируса Зика, содержащий гликановую петлю. Аминокислотные остатки, имеющие наибольшее количество контактов с МС, показаны зеленым цветом (SER146, GLN147, HIS148, MET151, ASP161, GLU162, THR366, GLU367), окружающие их отрицательно заряженные аминокислотные остатки – красным цветом (ASP42, GLU44, ASP155, GLU159, GLU329, ASP336, GLU370, GLU377).

Как видно из рисунка 5, распределение электростатического потенциала в области гликановой петли у вируса Зика (а,в) и вируса денге (б,г) различается. Гликановая петля Е белка вируса Зика состоит из 15 аминокислотных остатков, в том числе четырех отрицательно заряженных остатков, в то время как гликановая петля вируса денге состоит из 13 остатков, лишь два из которых отрицательно заряжены (ASP147 и GLU154). Вместе с тем, отрицательно заряженный остаток GLU367 Е белка вируса Зика создает дополнительный отрицательный потенциал в области гликановой петли, тогда как у вируса денге в этой позиции находится положительно заряженный остаток лизина LYS358, следом за которым располагается одноименно заряженный остаток LYS359. Положительный потенциал, создаваемый этими остатками лизина, компенсирует отрицательный потенциал, создаваемый следующими за ними остатками GLU360 и GLU361. Таким образом, обширная область отрицательного потенциала, окружающая гликановую петлю Е белка вируса Зика эффективно притягивает молекулы МС (рис. 5,а,в), в то время как гликановая петля вируса денге закрыта от

электростатических взаимодействий с молекулой МС областью положительного потенциала (рис. 5,б,г).

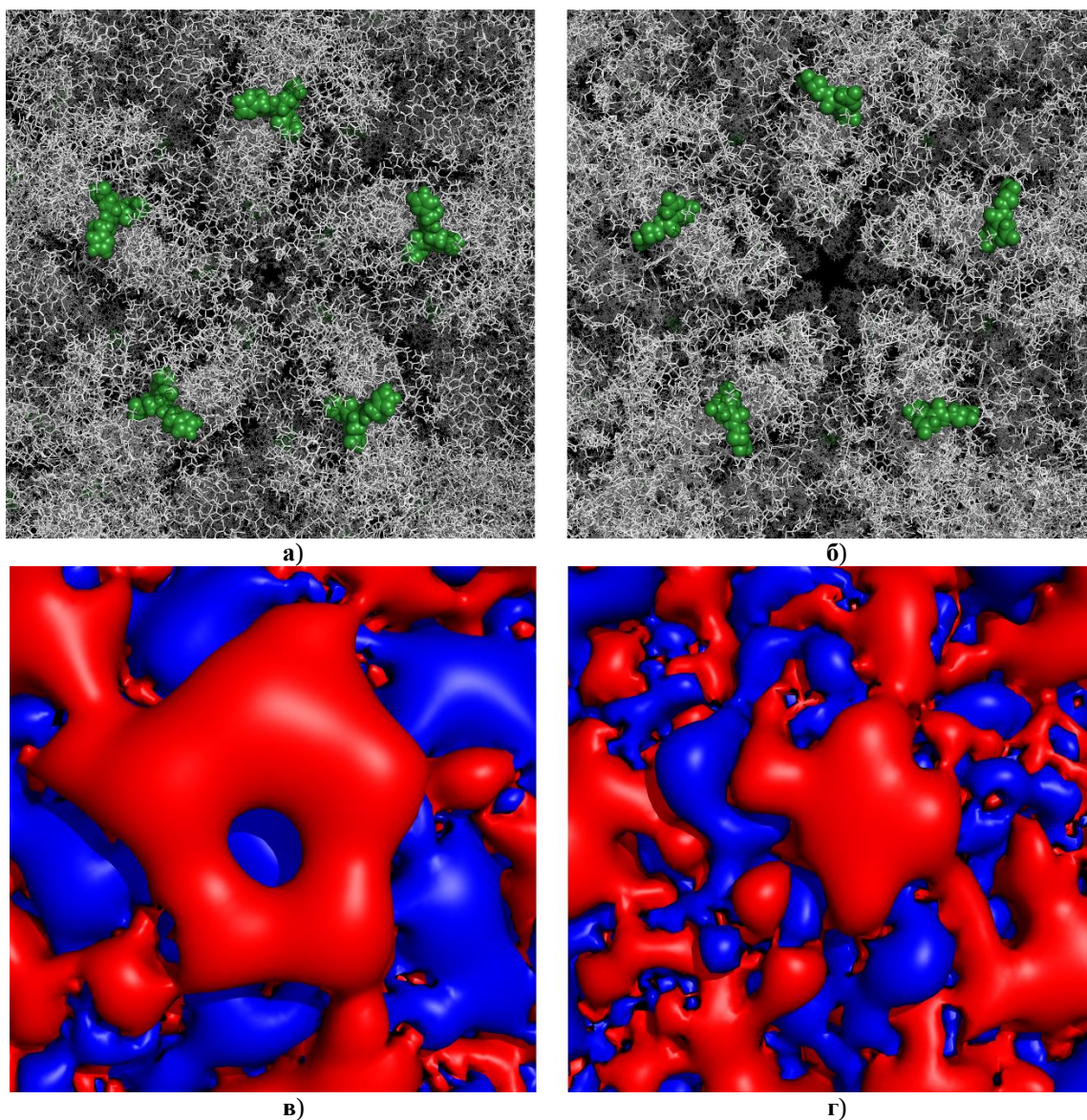


Рис. 5. Области на поверхности белковых оболочек вируса Зика – а) и вируса денге – б), содержащие аминокислотные остатки гликановой петли. Аминокислотные остатки Е белка вируса Зика, имеющие наибольшее количество контактов с МС (см. рис. 3), а также аналогичные остатки Е белка вируса денге окрашены в зеленый цвет. Эквипотенциальные электростатические поверхности, создаваемые электрическими зарядами оболочек вируса Зика – в) и вируса денге – г), в областях, соответствующих а) и б). Поверхность -10 мВ окрашена в красный цвет, а поверхность $+10$ мВ – в синий цвет.

В отличие от Е белка вируса Зика, молекулы МС имеют значительное количество контактов с аминокислотными остатками, входящими в ГАГ-связывающую петлю Е белка вируса денге (см. рис. 3). Аминокислотные остатки THR301 и ASN302, входящие в эту петлю, локализованы совместно с остатками GLY381 и ASP382. Большое количество контактов молекул МС в этой области обеспечивается отрицательно заряженными остатками GLU323, GLU327, ASP328, GLU360 и GLY381 (рис. 6). В месте схождения пяти мономеров Е белка эти остатки создают кольцевую область отрицательного потенциала, обеспечивающую многочисленные контакты с МС (рис. 5,г).

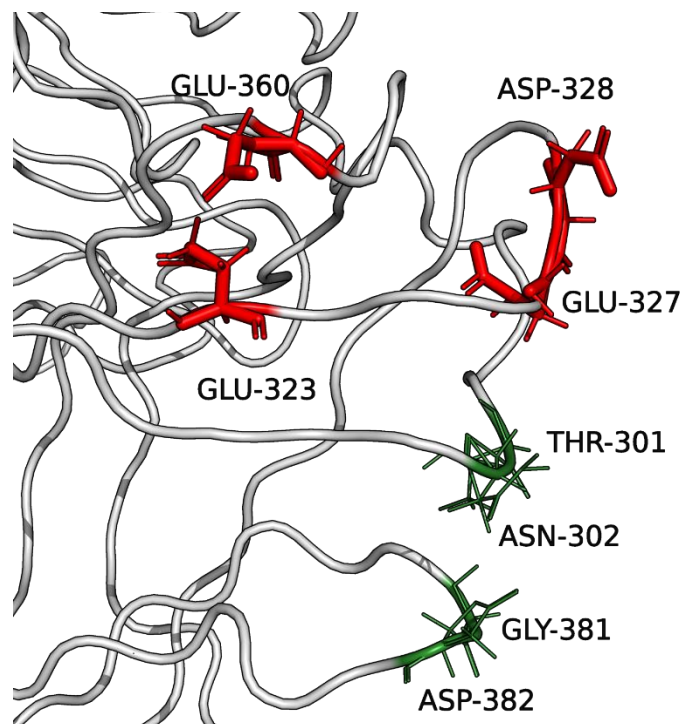


Рис. 6. Участок домена DIII Е белка вируса денге, содержащий ГАГ-связывающую петлю. Аминокислотные остатки, имеющие наибольшее количество контактов с МС, показаны зеленым цветом (THR301, ASN302, GLY381, ASP382), окружающие их отрицательно заряженные аминокислотные остатки – красным цветом (GLU323, GLU327, ASP328, GLU360).

Первым этапом проникновения флавивирусов в клетку является связывание вириона с ее поверхностью за счет взаимодействия Е белка с факторами прикрепления. В качестве таких факторов выступают протеогликаны с сульфатированными боковыми цепями, ГАГ, которые создают отрицательный заряд гликокаликса. Гликозилированный Е белок может вступать в электростатические взаимодействия с ГАГ, способствуя прикреплению вирионов и последующему заражению клеток [11, 21].

Методами мутационного анализа в белках оболочки флавивирусов ZIKV и DENV идентифицирована ГАГ-связывающая петля [18], которая находится в переходной области между доменами DI и DIII (рис. 3). Связывание малых молекул в областях Е белка, ответственных за первичное узнавание клетки-хозяина, может создавать препятствия в процессах прикрепления вирусов к клетке, а, следовательно, приводит к снижению их инфекционности. Е белок флавивирусов также имеет консервативный сайт гликозилирования в области, называемой гликановой петлей [19]. Предполагается, что гликозилированный остаток аспарагина и окружающие его остатки петли могут напрямую влиять на доступность петли слияния в домене DII, способствуя слиянию мембран и проникновению вирусов в клетку [20]. Ингибирование функций ГАГ-связывающей и гликановой петель Е белков флавивирусов является перспективной стратегией в противовирусной терапии.

В настоящей работе методами молекулярного моделирования нам впервые удалось показать, что МС обладает способностью электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженными аминокислотными остатками в областях гликановой петли Е белка вируса Зика и ГАГ-связывающей петли Е белка вируса денге. Взаимодействие МС с аминокислотными остатками Е белков, которые вовлечены в ранние стадии инфицирования клеток, может определять противовирусную активность МС, которая экспериментально показана в отношении различных оболочечных вирусов, в том числе флавивирусов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы в связи с развитием вычислительных средств, доступных широкому кругу исследователей, таких, как многоядерные центральные процессоры и мощные графические ускорители, методы молекулярного моделирования всё чаще применяются для поиска новых антимикробных соединений, в том числе с противовирусной активностью, изучения молекулярных механизмов действия уже известных препаратов, а также оптимизации их структуры и свойств.

В методе броуновской динамики, использованном в данной работе, молекулы рассматриваются как жесткие тела, не меняющие свою конформацию в процессе динамики. Несмотря на такое достаточно грубое приближение, этот метод позволяет проанализировать начальные стадии взаимодействия заряженных молекул антимикробных соединений со структурными компонентами целых вирусных оболочек и выявить области электростатических контактов с разрешением конкретных аминокислотных остатков, участвующих в таких взаимодействиях. Применение такого подхода позволило нам выявить особенности взаимодействия молекул МС с оболочками вируса Зика и вируса денге, и теоретически обосновать известное влияние МС на первые стадии жизненного цикла оболочечных вирусов, включающие первичное узнавание поверхности клетки-хозяина и слияние мембран.

Статья подготовлена в рамках реализации проекта «Научно-образовательный математический центр “Северо-Западный центр математических исследований имени Софьи Ковалевской”» (соглашение № 075-02-2025-1607 от 27 февраля 2025 г).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ohlow M.J., Moosmann B. Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure. *Drug Discovery Today*. 2011. V. 16. No. 3. P. 119–131. doi: [10.1016/j.drudis.2011.01.001](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.01.001)
2. Seghatchian J., Struff W.G., Reichenberg S. Main properties of the THERAFLEX MB-plasma system for pathogen reduction. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2011. V. 38. No. 1. P. 55–64. doi: [10.1159/000323786](https://doi.org/10.1159/000323786)
3. Gendrot M., Jardot P., Delandre O., Boxberger M., Andreani J., Duflot I., Le Bideau M., Mosnier J., Fonta I., Hutter S., La Scola B., Pradines B. In vitro evaluation of the antiviral activity of methylene blue alone or in combination against SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Medicine*. 2021. V. 10. No. 14. P. 3007. doi: [10.3390/jcm10143007](https://doi.org/10.3390/jcm10143007)
4. Zhukhovitsky V., Shevlyagina N., Zubasheva M., Russu L., Gushchin V., Meerovich G., Strakhovskaya M. Infectivity and Morphology of Bovine Coronavirus Inactivated In Vitro by Cationic Photosensitizers. *Viruses*. 2022. V. 14. No. 5. P. 1053. doi: [10.3390/v14051053](https://doi.org/10.3390/v14051053)
5. Bojadzic D., Alcazar O., Buchwald P. Methylene blue inhibits the SARS-CoV-2 spike–ACE2 protein-protein interaction – a mechanism that can contribute to its antiviral activity against COVID-19. *Frontiers in Pharmacology*. 2021. V. 11. P. 600372. doi: [10.3389/fphar.2020.600372](https://doi.org/10.3389/fphar.2020.600372)
6. Fedorov V., Kholina E., Khrushev S., Kovalenko I., Rubin A., Strakhovskaya M. What Binds Cationic Photosensitizers Better: Brownian Dynamics Reveals Key Interaction Sites on Spike Proteins of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2. *Viruses*. 2021. V. 13. No. 8. P. 1615. doi: [10.3390/v13081615](https://doi.org/10.3390/v13081615)
7. Kovalenko I., Kholina E., Fedorov V., Khrushev S., Vasyuchenko E., Meerovich G., Strakhovskaya M. Interaction of Methylene Blue with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Envelope Revealed by Molecular Modeling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. V. 24. No. 21. P. 15909. doi: [10.3390/ijms242115909](https://doi.org/10.3390/ijms242115909)

8. Васюченко Е.П., Холина Е.Г., Федоров В.А., Страховская М.Г., Коваленко И.Б., Рубин А.Б. Молекулярное моделирование взаимодействия метиленового синего с виropином коронавируса SARS-CoV-2. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2025. Т. 80. № 2. С. 96–104. doi: [10.55959/MSU0137-0952-16-80-2-4](https://doi.org/10.55959/MSU0137-0952-16-80-2-4)
9. Li Z., Lang Y., Sakamuru S., Samrat S., Trudeau N., Kuo L., Rugenstein N., Tharappel A., D'Brant L., Koetzner C.A., Hu S., Zhang J., Huang R., Kramer L.D., Butler D., Xia M., Li H. Methylene blue is a potent and broad-spectrum inhibitor against Zika virus in vitro and in vivo. *Emerging Microbes & Infections*. 2020. V. 9. No. 1. P. 2404–2416. doi: [10.1080/22221751.2020.1838954](https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1838954)
10. Kaufmann B., Rossmann M.G. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes and Infection*. 2011. V. 13. No. 1. P. 1–9. doi: [10.1016/j.micinf.2010.09.005](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.005)
11. Carbaugh D.L., Lazear H.M. Flavivirus Envelope Protein Glycosylation: Impacts on Viral Infection and Pathogenesis. *Journal of Virology*. 2020. V. 94. No. 11. Article No. 10.1128/jvi.00104-20. doi: [10.1128/jvi.00104-20](https://doi.org/10.1128/jvi.00104-20)
12. Fibriansah G., Tan J.L., Smith S.A., De Alwis R., Ng T.S., Kostyuchenko V.A., Jadi R.S., Kukkaro P., de Silva A.M., Crowe J.E., Lok S.-M. A highly potent human antibody neutralizes dengue virus serotype 3 by binding across three surface proteins. *Nature Communications*. 2015. V. 6. No. 1. P. 6341. doi: [10.1038/ncomms7341](https://doi.org/10.1038/ncomms7341)
13. Sirohi D., Chen Z., Sun L., Klose T., Pierson T.C., Rossmann M.G., Kuhn R.J. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*. 2016. V. 352. No. 6284. P. 467–470. doi: [10.1126/science.aaf5316](https://doi.org/10.1126/science.aaf5316)
14. PDBFixer. URL: <https://github.com/openmm/pdbfixer> (дата обращения: 25.09.2025).
15. Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2006. V. 65. No. 3. P. 712–725. doi: [10.1002/prot.21123](https://doi.org/10.1002/prot.21123)
16. Luger P., Dittrich B., Benecke L., Sterzel H. Charge density studies on methylene blue – a potential anti-Alzheimer agent. *Zeitschrift für Naturforschung B*. 2018. V. 73. No. 2. P. 99–108. doi: [10.1515/znb-2017-0165](https://doi.org/10.1515/znb-2017-0165)
17. Хрущёв С.С., Абатурова А.М., Дьяконова А.Н., Устинин Д.М., Зленко Д.В., Федоров В.А., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Моделирование белок-белковых взаимодействий с применением программного комплекса многочастичной броуновской динамики ProKSim. *Компьютерные исследования и моделирование*. 2013. Т. 5. № 1. С. 47–64. doi: [10.20537/2076-7633-2013-5-1-47-64](https://doi.org/10.20537/2076-7633-2013-5-1-47-64)
18. Kim S.Y., Zhao J., Liu X., Fraser K., Lin L., Zhang X., Zhang F., Dordick J.S., Linhardt R.J. Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. *Biochemistry*. 2017. V. 56. No. 8. P. 1151–1162. doi: [10.1021/acs.biochem.6b01056](https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01056)
19. Cheng M.L., Yang Y.X., Liu Z.Y., Wen D., Yang P., Huang X.Y., Dong H.L., Xu Y.P., Li X.F., Deng Y.Q. et al. Pathogenicity and structural basis of Zika variants with glycan loop deletions in the envelope protein. *Journal of Virology*. 2022. V. 96. No. 23. Article No. e00879-22. doi: [10.1128/jvi.00879-22](https://doi.org/10.1128/jvi.00879-22)
20. Goo L., DeMaso C.R., Pelc R.S., Ledgerwood J.E., Graham B.S., Kuhn R.J., Pierson T.C. The Zika virus envelope protein glycan loop regulates virion antigenicity. *Virology*. 2018. V. 515. P. 191–202. doi: [10.1016/j.virol.2017.12.032](https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.032)
21. Jolly C.L., Sattentau Q.J. Attachment Factors. In: *Viral Entry into Host Cells*. Eds. Pöhlmann S., Simmons G. New York: Springer, 2006. P. 1–23. doi: [10.1007/978-1-4614-7651-1_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7651-1_1)

Рукопись поступила в редакцию 30.09.2025, переработанный вариант поступил 14.10.2025.
Дата опубликования 18.10.2025.

Features of the Electrostatic Interaction of Methylene Blue with the Protein Coat of Flaviviruses

Vasyuchenko E.P.¹, Strakhovskaya M.G.^{1,2}, Kovalenko I.B.¹, Fursova P.V.¹, Rubin A.B.¹

¹*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

²*Scientific and Educational Mathematical Center, Kovalevskaya Northwestern Center for Mathematical Research, Pskov State University, Pskov, Russia*

Abstract. Among the many pharmacological properties of methylene blue, its antiviral activity against enveloped viruses, including flaviviruses, is well known. Flaviviruses pose a global threat to human health. This group of viruses includes Zika virus, which causes severe developmental disabilities when infected in utero, and dengue virus, which accounts for a significant proportion of all cases of diseases caused by flaviviruses. In this study, we created a complete map of methylene blue interactions with the protein coats of two flaviviruses. For the first time, Brownian dynamics analysis was used to analyze the interactions of methylene blue with amino acid residues of the Zika and dengue virus envelope proteins, which are involved in the early stages of cell infection, and to identify interactions that may underline the compound's known antiviral activity. It was found that a large region of negative potential surrounding the glycan loop of the Zika virus envelope protein effectively attracts methylene blue molecules, while the dengue virus glycan loop is shielded from electrostatic interactions with methylene blue by a region of positive potential. In turn, the loop of the dengue virus envelope protein, which mediates the primary binding of viruses to cells, can form a significant number of contacts with methylene blue molecules, which is not observed for a similar loop in the Zika virus envelope protein. Molecular modeling methods allowed us to theoretically substantiate the inhibitory effect of methylene blue on the early stages of the enveloped virus life cycle, which include primary recognition of the host cell surface and membrane fusion, as known from experimental studies.

Key words: *flaviviruses, Zika virus, dengue virus, envelope protein, methylene blue, Brownian dynamics, computer modeling*