

В.А. Козел

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН НА СТАБИЛЬНОСТЬ
ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА И ЕГО СРОДСТВО
К РЕЦЕПТОРУ В РАМКАХ РАЗРАБОТКИ НОВОГО ПРЕПАРАТА
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ**

Научный руководитель: ассист., магистр мед. наук В.В. Побойнев

Кафедра общей химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

V.A. Kozel

**EVALUATION OF THE EFFECT OF AMINO ACID SUBSTITUTIONS
ON THE STABILITY OF HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR
AND ITS AFFINITY FOR THE RECEPTOR IN THE DEVELOPMENT
OF A NEW DRUG FOR THE TREATMENT OF DIABETIC FOOT SYNDROME**

Tutor: assistant professor, master of medical sciences V.V. Poboinev

Department of General Chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Проведён анализ структуры эпидермального фактора роста человека, проведён *in silico* мутагенез аминокислотных остатков, входящих в амилоидогенные фрагменты. Определено влияние каждой аминокислотной замены на стабильность белка и на его аффинность к рецептору.

Ключевые слова: синдром диабетической стопы, аминокислотные замены, биоинформатика.

Resume. *In silico* analysis of the structure of the human epidermal growth factor was performed, *in silico* mutagenesis of amino acid residues included in amyloidogenic fragments was carried out. The effect of each amino acid substitution on the stability of the protein and its affinity to the receptor was determined.

Keywords: diabetic foot syndrome, amino acid substitutions, bioinformatics.

Актуальность. Сахарный диабет (СД) – это хроническое заболевание, которое возникает либо в случаях, когда поджелудочная железа не вырабатывает достаточное количество инсулина, либо когда организм не может эффективно использовать вырабатываемый инсулин. По данным ВОЗ, на сегодняшний день диабетом страдает около 422 млн человек, что составляет 6,028% от всего населения планеты. Статистика заболеваемости диабетом ежегодно растёт. Если ситуация будет развиваться теми же темпами, то к 2025 году количество пациентов с диабетом увеличится в 2 раза. К 2030 году сахарный диабет станет 7-й причиной смерти во всём мире. В Республике Беларусь на 1 января 2021 г. на диспансерном учете находилось 356 945 пациентов с сахарным диабетом, в том числе с СД 1 типа – 18 110 человек, СД 2 типа – 330 957 человек (распространенность 4,2%), гестационным сахарным диабетом – 511, другими специфическими типами диабета – 3 096. В общей структуре распространенности диабета в Беларуси СД 2-го типа занимает 94%. СД представляет собой реальную угрозу за счет ранней инвалидизации и высокой смертности от сосудистых катастроф. Диабет – единственное неинфекционное заболевание, взятое под контроль Организацией Объединённых Наций.

Одним из основных осложнений сахарного диабета является синдром диабетической стопы, который представляет собой комплекс анатомо-функциональных из-

менений, развивающихся на фоне диабетической нейропатии, микро- и макроангиопатии, остеоартропатии, способствующих повышенной травматизации и инфицированию мягких тканей стопы, развитию гнойно-некротического процесса и в запущенных случаях ведущий к ампутации. Heberprot-P – это единственный специфический инновационный кубинский продукт, содержащий рекомбинантный фактор роста эпидермиса человека для пери- и интраоперационной инфльтрации. Данный препарат ускоряет заживление глубоких и сложных язв, как ишемических, так и невропатических, и уменьшает количество ампутаций, связанных с диабетом.

Цель: выбор аминокислотных замен в эпидермальном факторе роста человека, повышающих его внутреннюю нестабильность и аффинность к рецептору.

Материалы и методы. Объектом исследования для данной работы послужила аминокислотная последовательность эпидермального фактора роста человека, полученная из PDB (PDB ID: 1IVO C). Влияние аминокислотных замен на стабильность структуры эпидермального фактора роста оценивали с помощью алгоритма PentaFold 3.0 [1]. Стабильность эпидермального фактора роста, а также способность структурных переходов оценивали при помощи алгоритма PentUnFOLD [2]. С помощью же данного алгоритма оценивали влияние аминокислотных замен на стабильность структуры эпидермального фактора роста. Моделирование 3D структур эпидермального фактора роста человека с аминокислотными заменами проводили с помощью программы Swiss Model [3], в качестве шаблона используя третичную структуру нативного эпидермального фактора роста. Для того, чтобы учесть влияние аминокислотных замен на энергию связывания эпидермального фактора роста человека с его рецептором мы также смоделировали структуру нативного белка (без аминокислотных замен) и определение изменения $\Delta\Delta G$ проводили относительно модели нативного ЭФРЧ. Изменение аффинности мутантного эпидермального фактора роста к его рецептору оценивали на основании $\Delta\Delta G$ с помощью программы mCsm-PP12 [4]. Значение $\Delta\Delta G$ должно быть максимальным (положительным), так как данный параметр находится как разность ΔG дикого типа (без аминокислотных замен) и ΔG эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой. Влияние аминокислотных замен на вероятность формирования бета-амилоида эпидермальным фактором роста человека определяли с помощью программы FoldAmyloid [5].

Результаты и их обсуждение. Вторичная структура ЭФРЧ представлена четырьмя бета-тяжами: Val19-Ile23, Lys28-Cys33, Tyr37-Ile38, Tyr44-Arg45. Однако указанные бета-тяжи отличаются по уровню стабильности, что показано при помощи алгоритма PentaFold 3.0. Стабильными являются первый и третий бета-тяжи, второй бета-тяж является метастабильным, а четвёртый бета-тяж – нестабильным. Действительно, согласно алгоритму PentaFold 3.0. стабильными аминокислотными остатками признаны лишь: Cys20, Met21, Tyr22 (входят в состав первого бета-тяжа), Cys33 (второй бета-тяж), Tyr37 (третий бета-тяж). Ещё 6 аминокислотных остатка являются метастабильными: Ile23 (первый бета-тяж); Ala30, Cys31, Asn32 (второй бета-тяж); Ile38 (третий бета-тяж). Остальные аминокислотные остатки входят в состав койла и только один из них, Arg41, является метастабильным. Остальные же аминокислотные остатки, входящие в состав койла, являются нестабильными.

С помощью алгоритма PentUnFOLD оценивали не только стабильность струк-

туры ЭФРЧ, но и возможность структурных переходов в данном белке. Данные алгоритма PentUnFOLD не только подтверждают результаты, полученные при анализе структуры алгоритмом PentaFold 3.0, но и детализируют их. Первый бета-тяж является стабильным, так как три его аминокислотных остатка (Cys20, Met21, Tyr22) с помощью алгоритма PentUnFOLD 1D и 2D признаны стабильными.

С помощью алгоритма PentUnFOLD проанализированы 437 аминокислотных замен в амилоидогенных фрагментах, показано их влияние на способность ЭФРЧ к структурным переходам. Из всех проанализированных аминокислотных замен отобраны лишь аминокислотные замены M21R и K48R. Аминокислотная замена M21R увеличивает внутреннюю неструктурированность эпидермального фактора роста человека, увеличивает его сродство к рецептору, не изменяя конформацию комплекса белка с рецептором, и не вызывает увеличение длины амилоидогенных фрагментов. Аминокислотная замена K48R не увеличивает внутреннюю неструктурированность эпидермального фактора роста человека, однако увеличение аффинности к рецептору максимально среди всех изученных аминокислотных замен. Данная аминокислотная замена не приводит к изменению конформации комплекса белка с рецептором и не вызывает увеличение длины амилоидогенных фрагментов.

Заключение. В результате проведенных *in silico* экспериментов установлено, что замены K48R и M21R могут использоваться в дальнейших исследованиях *in vitro* в рамках разработки нового препарата для лечения синдрома диабетической стопы. Информация о внедрении результатов исследования.

Информация о внедрении результатов исследования. По результатам настоящего исследования опубликовано 2 статьи в сборниках материалов, 1 тезисы докладов, получено 2 акта внедрения в образовательный процесс кафедры общей химии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Литература

1. Khrustalev, V. V. The PentaFOLD 3.0 Algorithm for the selection of stable elements of secondary structure to be included in vaccine peptides / V. V. Khrustalev // Protein Pept. Lett. – 2021. – Vol. 28. – P. 573–588.
2. The PentUnFOLD algorithm as a tool to distinguish the dark and the light sides of the structural instability of proteins / V. V. Poboinev [et al.] // Amino Acids. – 2022. – Vol. 54. – P. 1155–1171.
3. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes // A. Waterhouse [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2018. – Vol. 46. – P. 296–303.
4. mCSM-PPI2: predicting the effects of mutations on protein–protein interactions / H. M. C. Rodrigues [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2019. – Vol. 47. – P. 338–344.
5. Garbuzynskiy, S. O. FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence / S. O. Garbuzynskiy, M. Y. Lobanov, O. V. Galzitskaya // Bioinformatics. – 2010. – Vol. 26. – P. 326–332.