

В.А. Козел

**ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА
ЧЕЛОВЕКА В РАМКАХ РАЗРАБОТКИ НОВОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ**

*Научные руководители: ст. преп. А.Р. Козел,
ассист., магистр мед. наук В.В. Побойнев*

Кафедра общей химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

V.A. Kozel

**ASSESSMENT OF THE STABILITY OF HUMAN EPIDERMAL GROWTH
FACTOR IN THE DEVELOPMENT OF A NEW DRUG FOR
TREATMENT OF DIABETIC FOOT SYNDROME**

Tutors: senior teacher A.R. Kozel, assistant V.V. Poboinev

Department of General Chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. В данной статье проанализировано влияние аминокислотных замен на стабильность вторичной структуры эпидермального фактора роста человека, проведен молекулярный докинг белка с его рецептором, оценено изменение сводной энергии связывания лиганда с рецептором.

Ключевые слова: синдром диабетической стопы, эпидермальный фактор роста человека, биоинформатика.

Resume. In this article the effect of amino acid substitutions on the stability of the secondary structure of human epidermal growth factor was analyzed, protein-protein docking was performed. Also, the change of the free energy of binding between ligand and receptor was evaluated.

Keywords: diabetic foot syndrome, human epidermal growth factor, bioinformatics.

Актуальность. Последние десятилетия постоянно растёт количество пациентов с сахарным диабетом. Так, в 2019 г. число пациентов с сахарным диабетом в мире достигло 422 млн человек. Диабетическая стопа – серьёзное осложнение, возникающее у пациентов, страдающих данным заболеванием. Этот синдром затрагивает периферическую нервную систему, суставные и костные ткани стоп, кровеносные сосуды. Патология сопровождается язвенно-некротическими поражениями тканей, то есть развитием гангрены, а это уже состояние, которое угрожает жизни пациента. Очевидно, что с увеличением темпов распространения сахарного диабета и его осложнений будет расти и удельный вес пациентов с дефектами кожных покровов и мягких тканей нижних конечностей.

Диабетическая стопа (синдром диабетической стопы, СДС) представляет собой тяжёлое осложнение сахарного диабета в виде инфекции, язв или разрушения глубоких тканей, которое возникает в связи с нарушением макроструктуры стопы и микроциркуляции крови, по причине разрушения нервных окончаний и нервных волокон. У пациентов с диабетом снижается концентрация эпидермального фактора роста. Дефицит фактора роста ухудшает заживление ран, что приводит к хроническим незаживающим ранам, а иногда к ампутации. Диабетическая язва стопы наиболее трудно поддается лечению и сопряжена с наибольшим риском ампутации. Главная причина

ДС – это сахарный диабет (СД). Хронические раны на ногах у людей с сахарным диабетом встречаются в 4-15 % случаев.

Неберprot-P – это инновационный кубинский продукт, содержащий рекомбинантный фактор роста эпидермиса человека для пери- и интраоперационной инфльтрации; данные показывают, что он ускоряет заживление глубоких и сложных язв, как ишемических, так и невропатических, и уменьшает количество ампутаций, связанных с диабетом. Неберprot-P на данный момент является единственным специализированным препаратом, применяемым для лечения синдрома диабетической стопы. Но процент ампутаций, все же довольно высок, составляет 9-11%. Так же, остаются вопросы по экономической составляющей, времени лечения.

Цель: оценка влияния аминокислотных замен на стабильность эпидермального фактора роста человека и его аффинность к рецептору, в рамках разработки нового препарата для лечения синдрома диабетической стопы.

Задачи:

1. Определить влияние аминокислотных замен на стабильность вторичной структуры ЭФРЧ.
2. Определить влияние аминокислотных замен на аффинность ЭФРЧ к его рецептору.
3. Провести моделирование ЭФРЧ с аминокислотными заменами.
4. Провести молекулярный докинг нативного и мутантного ЭФРЧ к его рецептору.

Материал и методы. Объектом исследования в данной работе является аминокислотная последовательность ЭФРЧ (PDB ID: 1IVO, цепь C) [1]. Влияние аминокислотных замен на стабильность вторичной структуры определяли с помощью алгоритма PentUnFOLD [2]. 3D модели эпидермального фактора роста, содержащих аминокислотную замену, строили при помощи программы Swiss-Model [3], в качестве шаблона используя третичную структуру эпидермального фактора роста с его рецептором (PDB ID: 1IVO). С помощью программы HEX 8.0.0 [4] проводили докинг эпидермального фактора роста, имеющего аминокислотную замену, с его рецептором. Изменение энергии связывания отслеживали с помощью программы Prodigy [5]. Изменение аффинности мутантного эпидермального фактора роста человека к его рецептору оценивали также на основании $\Delta\Delta G$ с помощью программы mCsM-PPI2 [6]. Значение $\Delta\Delta G$ должно быть максимальным (положительным), так как данный параметр находится как разность ΔG нативного и ΔG эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой.

Результаты и их обсуждение. С помощью программы PentUnFOLD выявлено 29 аминокислотных замен, повышающих внутреннюю нестабильность ЭФРЧ (L15S, L15E, M21K, M21R, M21H, M21D, M21T, M21E, M21Q, L26A, L26G, L26P, K28D, Y29D, Y29E, Y29K, Y29M, Y29T, Y29A, Y29G, Y29Q, Y29R, Q43E, Y44A, Y44G, R45D, L47S, L47D, K48R). Из них 16 аминокислотных замен (Y29G, Y29A, Y29Q, Y29R, Y29E, Y29K, Y29T, Y29M, Y29D, L26G, L26A, L26P, K28D, Y44G, Y44A, R45D) вызывают появление полного внутренне неструктурированного состояния (IDPRs) (рисунок 1, 2).

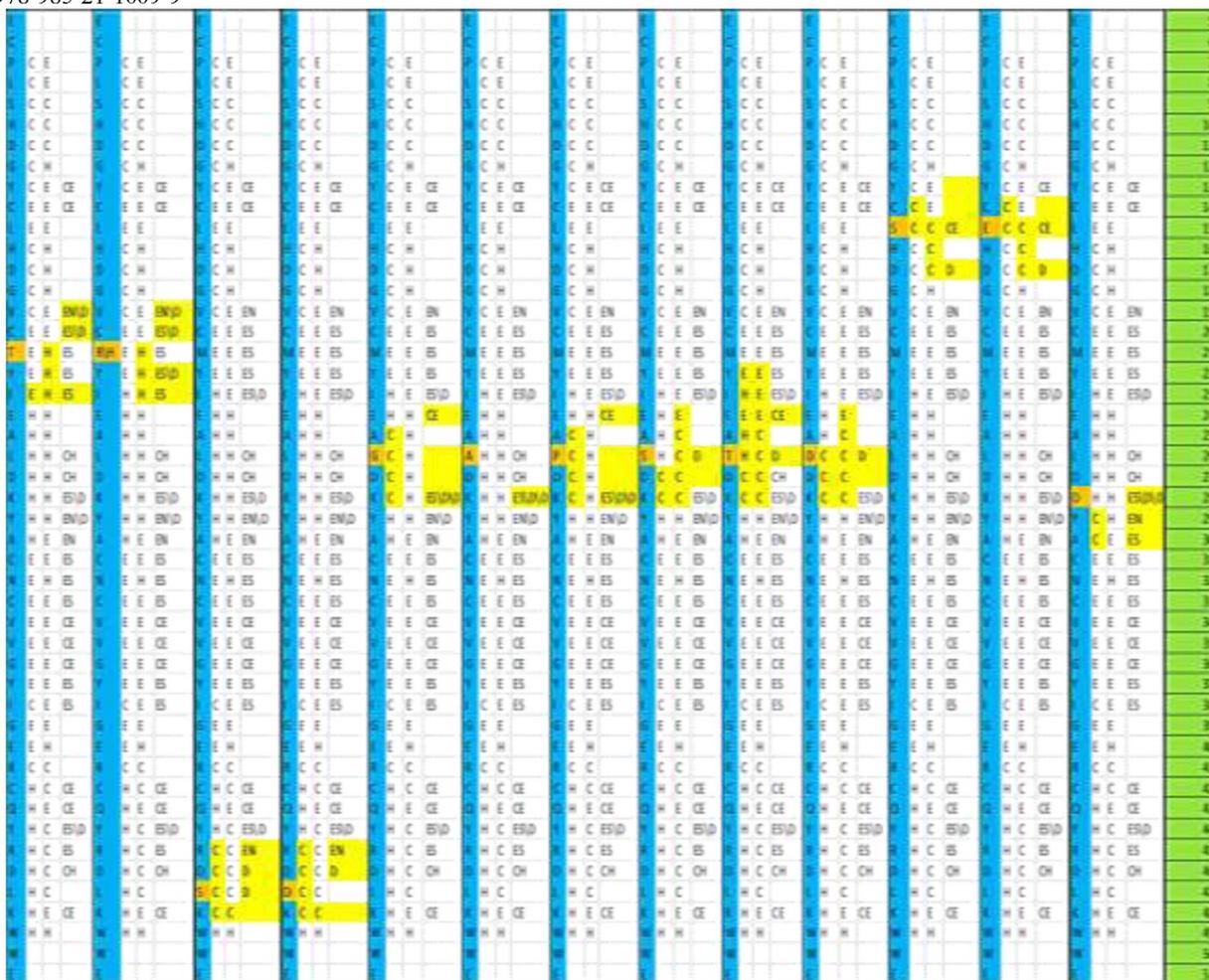


Рис. 2 – Изменение стабильности вторичной структуры ЭФРЧ, в зависимости от аминокислотной замены

Увеличение процентного содержания внутренне неструктурированного состояния может позволить достигнуть лучшего взаимодействия рецептора с его лигандом. Среди изученных аминокислотных замен, повышающих аффинность эпидермального фактора роста к рецептору (на основании алгоритма mCsM-PPI2), повышающих содержание IDPRs в лиганде (на основании алгоритма PentUnFOLD), а также понижающих энергию связывания (на основании алгоритма Prodigy) можно выделить аминокислотную замену M21R (рисунок 3).

В результате данной аминокислотной замены увеличивается способность первого бета-тяжа к структурному переходу в полностью неструктурированное состояние. Разница же в энергии связывания ЭФРЧ дикого типа и ЭФРЧ с аминокислотной заменой M21R при 37°C составила 0,3 ккал/моль, что обусловлено образованием трёх дополнительных взаимодействий между лигандом и рецептором.

ЗАМЕНА	АФФИННОСТЬ	PRODIGYpdb
bez	mCsM-PPI2	-16.2
M21K	0.115	-16.1
M21R	0.616	-16.5
M21H	-0.248	-16.0
M21D	-0.094	-15.8
M21T	-0.190	-16.3
M21E	-0.047	-15.9
M21Q	-0.129	-15.9
L26A	-1.275	-16.0
L26G	-1.531	-16.0
L26P	-2.432	-15.9
K28D	-0.216	-16.2
Y29D	-0.809	-16.2
Y29E	-0.700	-16.2
Y29K	-0.563	-16.3
Y29M	-0.651	-16.1
Y29T	-0.574	-16.2
Y29A	-0.623	-16.1
Y29G	-0.910	-16.1
Y29Q	-0.611	-16.2
Y29R	-0.539	-16.4
Q43E	1.469	-16.2
Y44A	-0.926	-16.8
Y44G	-1.04	-17.1
K48R	1.418	-16.4
L15E	-1.155	-16.4
L15S	-0.808	-16.3
L26T	-1.184	-16.7
L26D	-1.642	-16.2
L26S	-1.258	-16.6
L47S	-2.002	-16.4
L47D	-2.9	-16.4

Рис. 3 – $\Delta\Delta G$ аминокислотных замен, показывающие изменение аффинности модифицированного ЭФРЧ к его рецептору (на основании алгоритма mCsM-PPI2); изменение свободной энергии связывания модифицированного ЭФРЧ с его рецептором (на основании алгоритма Prodigy)

Выводы:

1. Выявлено 29 аминокислотных замен, повышающих внутреннюю нестабильность ЭФРЧ, 16 из которых вызывают появление IDPRs.
2. Аминокислотная замена M21R способствует структурному переходу первого бета-тяжа в IDPRs, повышая при этом сродство ЭФРЧ к его рецептору.

Литература

1. Berman, H. M. The Protein Data Bank / H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng [et al] // Nucleic Acids Research. – 2000. – Vol. 28. – P. 235-242.
2. Poboinev, V. V. The PentUnFOLD algorithm as a tool to distinguish the dark and the light sides of the structural instability of proteins / V. V. Poboinev, V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, [et al] // Amino Acids. – 2022. – P. 1-17.
3. Waterhouse, A. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes // A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert [et al] // Nucleic Acids Res. – 2018. – Vol. 46. – P. 296-303.
4. Macindoe, G. HexServer: an FFT-based protein docking server powered by graphics processors / G. Macindoe, L. Mavridis, V. Venkatraman [et al] // Nucleic Acids Research. – 2010. – Vol. 38. – P. 445-449.
5. Vangone, A. Prodigy: A Contact-based Predictor of Binding Affinity in Protein-protein Complexes / A. Vangone, A. Bonvin // Bio-protocol. – 2017. – Vol. 7. – N. e2124.
6. Rodrigues, C. H. M. mCSM-PPI2: predicting the effects of mutations on protein-protein interactions / H. M. C. Rodrigues, Y. Myung, D. E. V. Pires [et al] // Nucleic Acids Research. – 2019. – Vol. 47. – P. 338-344.