

В.А. Козел

**ДИЗАЙН НОВОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМА
ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ**

Научные руководители: магистр мед. наук, ассист. В.В. Побойнев,

ст. преп. А.Р. Козел

Кафедра общей химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

V.A. Kozel

**DESIGN OF A NEW DRUG FOR THE TREATMENT OF DIABETIC
FOOT SYNDROME**

Tutors: assistant professor V.V. Poboinev,

senior teacher A.R. Kozel

Department of General Chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. В данной статье проанализированы амилоидогенные фрагменты эпидермального фактора роста человека, проведен *in silico* мутагенез, оценено влияние аминокислотных замен на стабильность пептида.

Ключевые слова: синдром диабетической стопы, аминокислотная замена, аффинность.

Resume. In this article, amyloidogenic fragments of human epidermal growth factor were analyzed, *in silico* mutagenesis was performed, and the effect of amino acid substitutions on peptide stability was evaluated.

Keywords: diabetic foot syndrome, amino acid substitution, affinity.

Актуальность. Диабет представляет собой хроническое заболевание, развивающаяся в тех случаях, когда поджелудочная железа не вырабатывает достаточно инсулина или, имеется дефект рецептора к нему. Распространенным следствием неконтролируемого диабета является гипергликемия, или повышенный уровень содержания сахара в крови, со временем приводящая к серьезному повреждению многих систем организма, особенно нервов и кровеносных сосудов. В 2019 г. диабет стал непосредственной причиной 1,5 миллиона случаев смерти, и 48% всех связанных с диабетом случаев смерти произошли в возрасте до 70 лет. С 2000 по 2016 г. преждевременная смертность от диабета увеличилась на 5%.

Диабетическая стопа (синдром диабетической стопы, СДС) – это 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. 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 инфильтрации; данные показывают, что он ускоряет заживление глубоких и сложных язв,

как ишемических, так и невропатических, и уменьшает количество ампутаций, связанных с диабетом. Neberprot-P на данный момент является единственным специализированным препаратом, применяемым для лечения СДС. Но, процент ампутаций, всё же довольно высок, и составляет 9-11%. Так же, остаются вопросы по экономической составляющей, времени лечения.

Цель: выбор аминокислотных замен, повышающих аффинность модифицированного фактора роста человека к рецептору и стабильность самого белка, в рамках разработки нового препарата для лечения синдрома диабетической стопы.

Материал и методы. Объектом исследования является эпидермальный фактор роста человека, аминокислотная последовательность которого была полученная из PDB (PDB ID: 1IVO C). Амилоидогенные фрагменты определяли с помощью программы FoldAmyloid [1]. Стабильность структуры эпидермального фактора роста после аминокислотной замены оценивали с помощью алгоритмов iStable [2] и PentaFold 3.0 [3]. Алгоритм iStable определяет изменение стабильности белка в результате аминокислотных замен на основании значения $\Delta\Delta G$ ($\Delta\Delta G = \Delta G_{исх} - \Delta G_{мут}$). В качестве исходных параметров была установлена температура 37°C и pH = 7,4. PentaFold 3.0 работает с 3D структурами белков и требует определения вторичной структуры исследуемого белка при помощи алгоритма DSSP [4]. Кроме того, алгоритм PentaFold 3.0 определяет влияние внесённых аминокислотных замен на формирование элементов вторичной структуры. Изменение аффинности мутантного эпидермального фактора роста к его рецептору оценивали также на основании $\Delta\Delta G$ с помощью программы mCsM-PPI2 [5].

Результаты и их обсуждение. Согласно алгоритму FoldAmyloid [1], в эпидермальном факторе роста выделяют два амилоидогенных фрагмента: Cys20-Glu24 и Cys42-Leu52. По нашей гипотезе внесение аминокислотной замены должно уменьшить или вовсе привести к нулю вероятность формирования амилоидогенного фрагмента, а также повысить стабильность самого пептида и его аффинность к рецептору.

Находясь в середине белка фрагмент Cys20-Glu24 контактирует с многочисленными аминокислотными остатками. Поэтому, чтобы оценить влияние аминокислотных замен на стабильность данного фрагмента мы проанализировали как аминокислотные замены внутри данного фрагмента, так до и после данной амилоидогенной области (по пять аминокислотных до и после). На основании алгоритма mCsM-PPI2 [5] были получены значения $\Delta\Delta G$. Большинство аминокислотных замен снижают аффинность модифицированного эпидермального фактора роста к его рецептору, так как значение $\Delta\Delta G$ является отрицательным.

Наибольшее значение $\Delta\Delta G$ характерно для замен M21Y, K28Q, K28S, K28H. Однако, аминокислотные замены M21Y и K28H увеличивает амилоидогенный потенциал эпидермального фактора роста. Причём после аминокислотной замены K28H появляется новый амилоидогенный фрагмент Asp27-Cys33. Аминокислотные замены K28Q и K28S не влияют на вероятность формирования бета-амилоида согласно алгоритму FoldAmyloid [1]. $\Delta\Delta G$ в результате аминокислотной замены M21K не столь велико, как в выше проанализированных случаях (0,115), однако после данной замены амилоидогенный потенциал всего фрагмента Cys20-Glu24 стал ниже порогового уровня.

Согласно же алгоритму PentaFold 3.0 [3] в результате аминокислотной замены M21K уменьшается стабильность первого бета-тяжа: аминокислотные остатки Lys21 и Tyr22 из стабильного состояния переходят в метастабильное состояние. Также уменьшается и стабильность второго бета-тяжа: стабильный остаток Cys33 после аминокислотной замены M21K определяется как нестабильный.

Заключение. В эпидермальном факторе роста человека обнаружено два фрагмента, обладающих амилоидогенным потенциалом: Cys20-Glu24 и Cys42-Leu52. В результате проведенных *in silico* экспериментов отобрана наиболее перспективная замена в середине эпидермального фактора роста для дальнейший *in silico* и *in vitro* экспериментов – M21K, которая снижает вероятность образования бета-тяжей в эпидермальном факторе роста человека и значительно снижает амилоидогенный потенциал фрагмента Cys20-Glu24.

Информация о внедрении результатов исследования. По результатам настоящего исследования опубликована 1 статья в сборниках материалов, 1 тезисы докладов, получен 1 акт внедрения в образовательный процесс кафедры общей химии.

Литература

1. 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.
2. Chen, C.W. iStable 2.0: Predicting protein thermal stability changes by integrating various characteristic modules // C. W. Chen, M. H. Lin, C. C. Liao [et al] // Comput. Struct. Biotechnol. J. – 2020. – Vol. 18. – P. 622-630.
3. 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.
4. Kabsch, W. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features / W. Kabsch, C. Sander // Biopolymers. – 1983. – Vol. 22. – P. 2577-2637.
5. 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.