

Г.Ф. Куракин, Н.П. Лопина, Г.Е. Бордина

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПОКСИНА A₄ С ЭСТРОГЕННЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ

Кафедра химии

ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинской университет Минздрова России

В статье изложены результаты проведения молекулярного моделирования связывания противовоспалительного эйкозаноида липоксина A₄ с эстрогенными рецепторами (ЭР) методом фармакофорного наложения и докинга в разные структуры ЭР. Результаты моделирования свидетельствуют, что липоксин A₄ при связывании с ЭР принимает изогнутое положение, приближаясь по геометрии к эстрогенам и образуя аналогичные гидрофобные контакты. При этом боковые гидроксигруппы липоксина (предположительно 5-ОН и 15-ОН) располагаются подобно концевым гидроксигруппам эстрогенов и образуют аналогичные водородные связи с аминокислотными остатками рецептора, необходимые для активации. В полученных моделях не было достоверно существующих водородных связей карбоксильной группы липоксина с рецептором.

Ключевые слова: липоксин A₄, эстрогенные рецепторы, докинг, фармакофор, молекулярное моделирование.

MOLECULAR MODELING OF INTERACTION BETWEEN LIPOXIN A₄ AND ESTROGEN RECEPTORS

G.F. Kurakin, N.P. Lopina, G.E. Bordina

Tver State Medical University

The article presents the results of molecular modelling of binding of anti-inflammatory eicosanoid lipoxin A₄ to estrogen receptors (ER) using pharmacophoric superimpositions and docking in different ER structures. Modeling results demonstrate that lipoxin A₄ takes up an arcuated position when binding ER becoming geometrically similar to estrogens and forming analogous hydrophobic contacts. Therewith side hydroxyl groups of the lipoxin (presumably 5-OH and 15-OH) are situated like end hydroxyl groups of estrogens and form analogous necessary for activation hydrogen bonds with amino acid residues of the receptor. There were no veridically existing hydrogen bonds between carboxyl group of the lipoxin with the receptor in obtained models.

Key words: lipoxin A₄, estrogen receptors, docking, pharmacophore, molecular modeling.

Введение

Липоксины – это небольшая группа эйкозаноидов с противовоспалительным и иммуномодулирующим действием [1]. Они синтезируются по липоксигеназному пути посредством последовательного окисления арахидоновой кислоты различными изоформами липоксигеназы (LOX) – 5-LOX, 12-LOX и 15-LOX.

Из этих соединений наиболее изученным является липоксин A₄. Он ингибирует хемотаксис, адгезию и миграцию иммунных клеток, одновременно подавляя продукцию провоспалительных цитокинов. По современным представлениям, данный медиатор действует через рецепторы цистеиниловых лейкотриенов; рецептор, сцепленный с G-белком 32 (G-protein coupled receptor 32, GPR32); формилпептидный рецептор 2, также называемый рецептором липоксина A₄ (Formyl peptide receptor 2/LX A₄ receptor, FPR2/ALX).

Помимо этого липоксин A₄ действует на ядерные рецепторы – арил-углеводородный рецептор (aryl hydrocarbon receptor, Ah-receptor) и, что более важно, эстрогенные рецепторы (ЭР) [1].

Недавно было установлено, что липоксин A₄ связывается с эстрогенным рецептором альфа (ЭР α) с высокой аффинностью, конкурируя при этом с эстрадиолом и оказывая эффекты, аналогичные эффектам эстрогенов [2]. Это позволяет предположить,

что липоксин связывается с тем же участком, что и эстрадиол.

В последнее время также накоплены данные об эффективности липоксина A₄ при экспериментальном эндометриозе [3], в связи с чем он рассматривается как потенциальное лекарственное средство для лечения эндометриоза у человека.

Наблюдаемые эффекты в отношении эндометрия предположительно ассоциированы с противовоспалительным и антиангиогенным действием липоксина [4]. В исследовании на пациентках с эндометриозом было также показано, что данный агент регулирует экспрессию эстрогенного рецептора бета (ЭР β) [5].

Таким образом, на сегодняшний день неясно, связано ли прямое действие липоксина на рецепторы эстрогенов с его благоприятным эффектом при эндометриозе.

Однако интерес к липоксину A₄ с точки зрения использования в лечении гинекологических заболеваний с учетом его возможного эстрогеноподобного эффекта диктует необходимость точного знания структурных основ взаимодействия данного агента с ЭР. Такие данные могут позволить рационально предусматривать наличие или отсутствие эстрогенного эффекта при создании в будущем новых лекарственных препаратов на основе липоксина.

На сегодняшний день хорошо известно, как связывается с ЭР множество стероидных и нестероидных лигандов. Данные рецепторы являются членами суперсемейства ядерных рецепторов и представлены типами альфа и бета. Они включают в себя два основных домена: ДНК-связывающий и лиганд-связывающий. Последний включает в себя связывающий участок, имеющий вид глубокой узкой щели, в которую входит плоская молекула эстрогена – стероида или нестероидного вещества с эстрогенным действием [6].

Боковые «стенки» лиганд-связывающей щели выстланы аминокислотными остатками, образующими гидрофобные связи с «сердцевинной» частью молекулы лиганда. Однако для связывания и активации критически необходимы полярные «концевые» группы эстрогена. Одна из них образует водородные связи с остатками глутаминовой кислоты (Глу353 в рецепторе альфа, Глу305 в рецепторе бета) и аргинина (Арг394 в ЭР α , Арг346 в ЭР β), а вторая – с остатком гистидина (Гис524 в рецепторе альфа, Гис475 в рецепторе бета) [6–7].

Соответственно, фармакофор типичного эстрогена состоит из гидрофобной сердцевинки и полярных групп на концах молекулы.

Напротив, антагонисты ЭР, во-первых, могут не связываться с остатком гистидина, во-вторых, имеют объемную боковую цепь, которая не уместается в связывающей полости и выходит за ее пределы, раздвигая спирали рецептора и тем самым блокируя переход в активную конформацию.

Однако изложенная выше информация накоплена на материале исследования лигандов иной химической природы, нежели липоксины – стероидных гормонов и фенольных соединений. Данные о структурных основах связывания производных жирных кислот, в том числе липоксинов, с ЭР в литературе отсутствуют.

Цель настоящей работы – восполнить имеющийся пробел в знании структурных основ связывания липоксина A_4 с ЭР на молекулярном уровне.

Материалы и методы

В работе использовались методы компьютерного молекулярного моделирования. Структура липоксина A_4 получена из базы данных ZINC Database (<http://zinc.docking.org/>) [8], структуры ЭР – из базы данных PDB (<https://www.rcsb.org/>) [9]. Использовались 5 структур ЭР со следующими PDB ID – 1a52 [10], 1ere [7], 1x7j [11], 1nde [12], 2ouz [13].

Фармакофорные наложения выполнялись в доступной онлайн среде Pharmit (<http://pharmit.csb.pitt.edu/>) [14]. Молекулярный докинг проводился в программе AutoDock Vina [15] с подготовкой и анализом в AutoDockTools (ADT) [16]. Редактирование полученных комплексов выполнялось в программе UCSF Chimera [17], заключительный анализ взаимодействий – в онлайн-приложении PoseView [18–19] на базе сервиса ProteinsPlus (<http://proteins.plus/>).

Результаты и обсуждение

Фармакофорный скрининг в Pharmit показал, что липоксин при связывании с ЭР потенциально может имитировать фармакофор эстрогенов двумя способами.

В первом варианте карбоксильная группа липоксина A_4 соответствует одной из концевых гидроксигрупп эстрогена, второй же концевой гидроксигруппе эстрогена соответствует 15-ОН-группа липоксина (рис. 1).

Вторая возможность предполагает наложение на одну полярную группу эстрогена 5-ОН- или 6-ОН-группы липоксина, в то время как второй гидроксигруппе эстрогена также соответствует 15-ОН-группа липоксина (рис. 2).

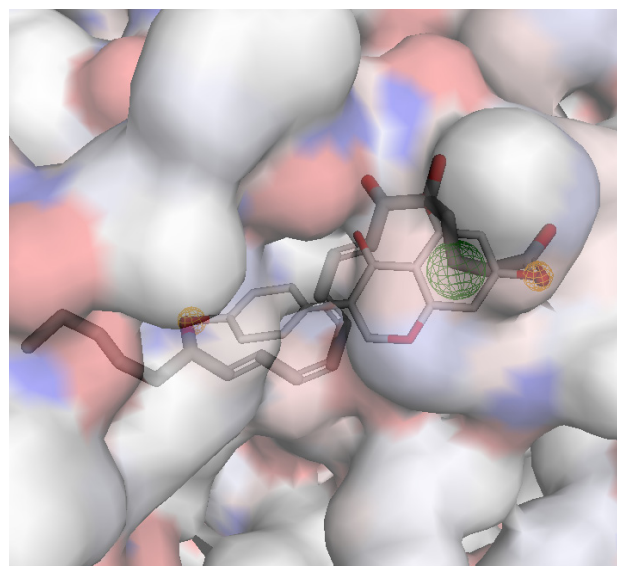


Рис. 1. Первый вариант фармакофорного наложения липоксина A_4 на эстроген. В качестве эстрогена использован генистеин в комплексе с ЭР β (PDB ID 1x7j [11]). Изображение получено в среде Pharmit [14]

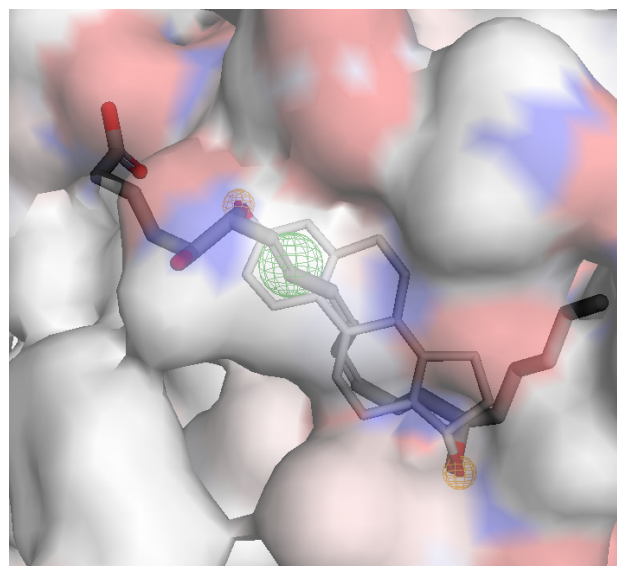


Рис. 2. Второй вариант фармакофорного наложения липоксина A_4 на эстроген. В качестве эстрогена использован эстрадиол в комплексе с ЭР α (PDB ID 1ere [7]). Изображение получено в среде Pharmit [14]

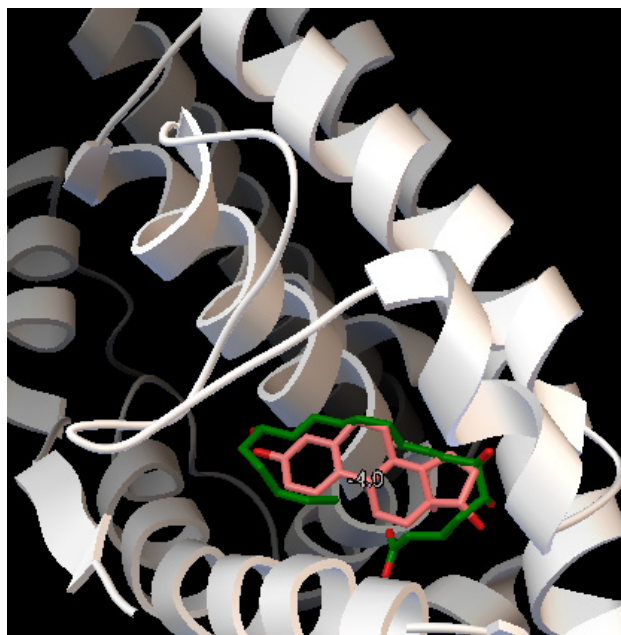


Рис. 3. Наложение липоксина на эстрадиол при докинге в ЭР α (PDB ID 1ere [7]). Изображение получено с помощью AutoDockVina/ADT [15–16]

Для оценки биологической активности более применимы результаты докинга.

Лиганд-связывающая щель ЭР в связанной с агонистом конформации замкнута «наглухо» [7]. Однако структура с PDB ID 1a52 [10] имеет отверстие в молекулярной поверхности сайта связывания, которое присутствует во всех структурах ЭР, связанных с антагонистами, и обусловлено уже упоминавшейся протрузией части молекулы антагониста наружу из связывающей щели.

При докинге в такие структуры липоксин занимает положение, при котором его «хвост» выходит наружу за пределы связывающего участка подобно боковой цепи антагониста. При этом внутри остается небольшой отрезок молекулы с карбоксильной группой. Такое связывание представляется недоста-

точно эффективным как с позиций агонизма, так и с позиций антагонизма. Биологическая значимость таких конформаций вызывает сомнение.

При докинге в структуры рецептора, воспроизводящие замкнутую щель (PDB ID:1x7j [11], 1ere [7]), липоксин A₄ занимает конформацию, которая имитирует эстроген расположением полярных групп, образующих водородную связь.

При этом в результатах докинга отсутствуют конформации, в которых карбоксильная группа совмещается с одной из гидроксильных групп эстрогена и участвует в активации рецептора, как было предсказано в первом варианте наложения в Pharmit.

Наоборот, докинг в данных случаях всецело подтверждает второй вариант. Занимая связывающий участок, липоксин изгибается в дугу, при этом гидрофобная его часть как бы обводит эстроген по контуру, имитируя его геометрическую форму (рис. 3).

При этом 5-ОН-группа липоксина занимает позицию одной из концевых гидроксигрупп эстрогена и образует водородные связи с Гис524 в ЭР α (Гис475 в ЭР β). Позицию второй концевой гидроксигруппы занимает 15-ОН-группа липоксина, которая образует водородные связи с глутаминовой кислотой (Глу353 в рецепторе альфа, Глу305 в рецепторе бета) и аргинина (Арг394 в ЭР α , Арг346 в ЭР β).

Главная цепь липоксина образует гидрофобные контакты, аналогичные таковым для эстрогенов. Примечательно, что липоксин образует гидрофобный контакт с остатком фенилаланина (Фен404 в ЭР α , Фен356 в ЭР β).

Рис. 4–6 наглядно демонстрируют сходство вычисленных по результатам докинга связей эстрадиола, генистеина и липоксина с ЭР β . Заметно сходство геометрии связывания.

Необходимо отметить, что функция скоринга программы AutoDock Vina в таком случае определяет энергию связывания таких конформаций как низкую по модулю (–4 – -5 ккал/моль). Это означает малую энергетическую выгоду такого связывания.

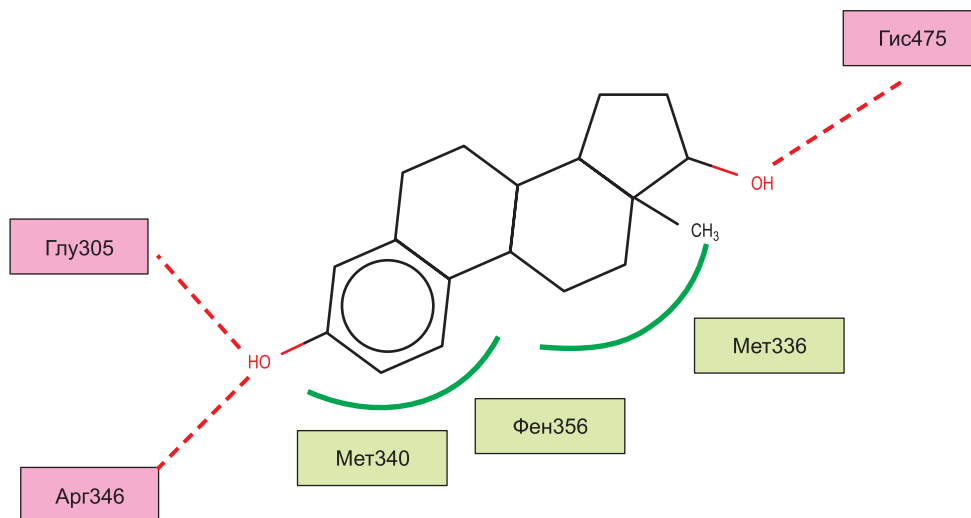


Рис. 4. Предполагаемые связи эстрадиола с ЭР β (на основе структуры PDB ID: 5toa [20])

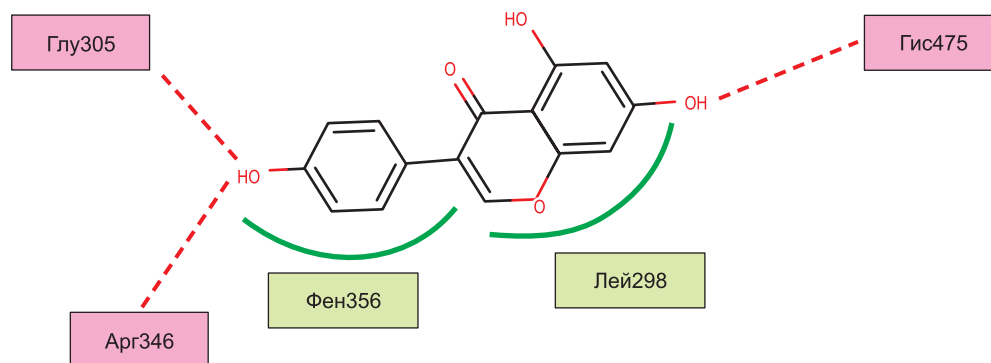


Рис. 5. Предполагаемые связи генистеина с ЭРβ (на основе структуры PDB ID: 1x7j [11])

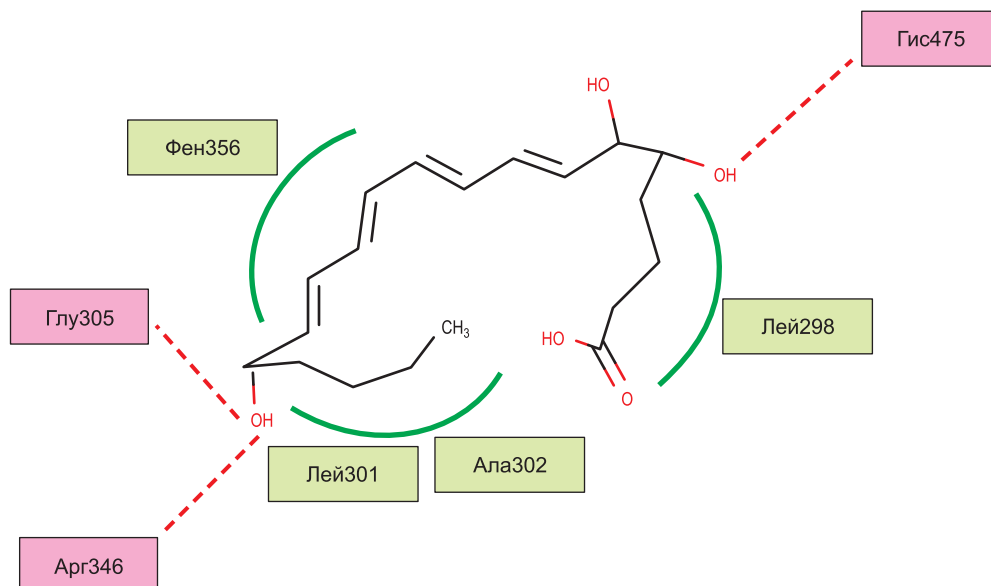


Рис. 6. Предполагаемые связи липоксина А₄ с ЭРβ (на основе докинга)

Наличие таких конформаций в результатах поиска может объясняться постановкой задачи: прицельный докинг в небольшую замкнутую связывающую полость лишает лиганд возможности занять иную позицию.

Докинг показал, как липоксин может связываться и активировать рецептор, но на основе перечисленных моделей нельзя сказать, имеет ли место такое связывание с реальным рецептором.

В 2002 году в литературе было описано новое семейство лигандов эстрогенных рецепторов – производных триазина [12]. Структура ЭРβ с одним из таких лигандов опубликована в банке данных PDB (PDB ID 1nde [12]).

Представленный в структуре лиганд ведет себя как антагонист по отношению к ЭРβ и связывается с ним характерным для антагонистов образом: пиперазиновый цикл выходит за пределы связывающего участка и связывается с Асп303.

При фармакофорном наложении в Pharmit липоксин А₄ тесно совмещается с пиперазиновым, триазиновым и фенильным фрагментами молекулы, частично выходя за пределы связывающего участка и воспроизводя водородные связи антагонистов.

Однако при докинге в эту же структуру в энергетически наиболее выгодной конформации липоксин размещается целиком внутри связывающего участка, не выходя за его пределы, и при этом повторяет конформации, описанные выше:

- 5-ОН-группа липоксина занимает позицию одной из концевых гидроксигрупп эстрогена и образует водородные связи с Гис524 в ЭРа (Гис475 в ЭРβ);
- позицию второй концевой гидроксигруппы занимает 15-ОН-группа липоксина, которая образует водородные связи с глутаминовой кислотой (Глу353 в рецепторе альфа, Глу305 в рецепторе бета) и аргинина (Арг394 в ЭРа, Арг346 в ЭРβ);
- главная цепь липоксина образует гидрофобные контакты, аналогичные таковым для эстрогенов, в том числе гидрофобные контакты с остатком фенилаланина (Фен404 в ЭРа, Фен356 в ЭРβ).

Таким образом, в данной структуре энергетически наиболее выгодной оказывается конформация, характерная для агонистов. Отличие конформации липоксина состоит в том, что она более «вытянута в

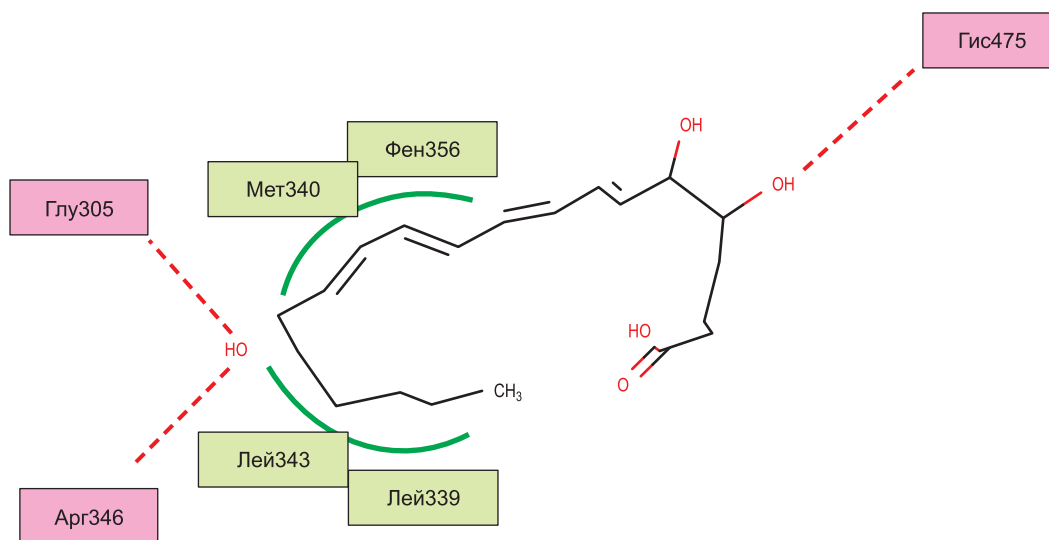


Рис. 7. Предполагаемые связи липоксина А₄ с ЭРβ при докинге в структуру 1nde [12]

длину» при сохранении той же формы и аналогичных взаимодействий. В таком положении соотношение «длины» к «ширине» молекулы лиганда оказывается выше, чем у стероидных эстрогенов (рис. 7).

Несомненно, это согласуется с тем фактом, что лиганд – производное триазина – менее массивен, что делает связывающий участок модели более длинным и узким.

Однако в данной модели липоксину энергетически выгодно занять положение внутри связывающей щели, а не выходить за ее пределы, как в структуре 1a52 [10], хотя ввиду присутствия антагониста связывающий участок «открыт» и стерического препятствия к занятию такой конформации нет. Энергия связывания липоксина при этом достаточно высока (-7 ккал/моль).

Данные соображения свидетельствуют о том, что липоксин, скорее всего, на самом деле занимает в ЭР описанную выше конформацию, и она может быть правдоподобна с точки зрения энергии связывания.

Следует отметить, что ЭР уникальны своей относительной неспецифичностью: круг связываемых ими химических структур весьма широк [7]. Помимо стероидных эстрогенных гормонов, это различные фенольные соединения, в том числе используемые в медицине в качестве лекарственных препаратов. Однако при этом все известные до сегодняшнего дня лиганды имеют общую особенность – гидроксигруппа, связывающаяся с остатками гистидина и аргинина в связывающем участке, должна быть присоединена как заместитель к ароматической структуре, которая образует стэкинговое взаимодействие с остатком фенилаланина (Фен404 в ЭР α , Фен356 в ЭР β) [6, 7].

Данное взаимодействие считалось до сегодняшнего дня одним из ключевых, но наблюдаемый нами случай липоксина А₄ заставляет еще раз пересмотреть это положение. Важно ли это ароматическое взаимодействие для всех лигандов? Образует ли липоксин какие-то дополнительные, пока не иден-

тифицированные нами, связи с ЭР, которые компенсируют отсутствие ароматического стэкинга? Эти вопросы требуют дальнейшего изучения.

Заключение

Проведенное моделирование показало, что липоксин А₄ при связывании с ЭР изгибается дугообразно, имитируя геометрию эстрогена. При этом необходимые для активации рецептора водородные связи образуют боковые группы липоксина А₄ (предположительно 5-ОН и 15-ОН-группы). Гидрофобные взаимодействия липоксина А₄ аналогичны образуемым эстрогенами. Полученные данные могут быть использованы для создания новых противовоспалительных и гормональных препаратов.

Литература/References

1. Canny, G.O. The role of Lipoxin A4 in endometrial biology and endometriosis / G.O. Canny, B.A. Lessey // *Mucosal immunology*. – 2013. – Vol. 6, № 3. – P. 439.
2. Lipoxin A4 is a novel estrogen receptor modulator / R. Russell [et al.] // *The FASEB Journal*. – 2011. – Vol. 25, № 12. – P. 4326–4337.
3. Chen, Q. The inhibitory effect of 15-R-LXA4 on experimental endometriosis / Q. Chen, W. Zhou, D. Pu // *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. – 2009. – Vol. 145, № 2. – P. 200–204.
4. Lipoxin A4 Inhibits the Development of Endometriosis in Mice: The Role of Anti-Inflammation and Anti-Angiogenesis / Xu Z. [et al.] // *American journal of reproductive immunology*. – 2012. – Vol. 67, № 6. – P. 491–497.
5. Chen, S. Lipoxin A4 regulates expression of the estrogen receptor and inhibits 17 β -estradiol induced p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation in human endometriotic stromal cells / S. Chen, R.F. Wu., L. Su // *Fertility and sterility*. – 2014. – Vol. 102, № 1. – P. 264–271.
6. Miller, C. A brief on the structure and function of estrogen receptor alpha (BCMB8010 Enzyme Project) / C. Miller [Electronic resource] – URL: https://www.researchgate.net/publication/282878976_A_brief_on_the_structure_and_function_of_estrogen_receptor_alpha_BCMB8010_Enzyme_Project. – Accessed: 21.05.2018.

7. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor / A.M. Brzozowski [et al.] // *Nature*. – 1997. – Vol. 389, № 6652. – P. 753.
8. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology / J.J. Irwin [et al.] // *Journal of chemical information and modeling*. – 2012. – Vol. 52, № 7. – P. 1757–1768.
9. The Protein Data Bank / H.M. Berman [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – Vol. 28. – P. 235–242.
10. *Tanenbaum, D.M.* Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains / D.M. Tanenbaum, Y. Wang, S.P. Williams, P.B. Sigler // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 95, № 11. – P. 5998–6003.
11. *Manas, E.S.* Understanding the selectivity of genistein for human estrogen receptor- β using X-ray crystallography and computational methods / E.S. Manas, Z.B. Xu, R.J. Unwalla, W.S. Somers // *Structure*. – 2004. – Vol. 12, № 12. – P. 2197–2207.
12. A new series of estrogen receptor modulators that display selectivity for estrogen receptor β / B.R. Henke [et al.] // *Journal of medicinal chemistry*. – 2002. – Vol. 45, № 25. – P. 5492–5505.
13. The 2.0 Å crystal structure of the ER α ligand-binding domain complexed with lasofoxifene / F.F. Vajdos [et al.] // *Protein science*. – 2007. – Vol. 16, № 5. – P. 897–905.
14. *Sunseri, J.* Pharmit: interactive exploration of chemical space / J. Sunseri, D.R. Koes // *Nucleic acids research*. – 2016. – Vol. 44, № W1. – P. W442–W448.
15. *Trott, O.* AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading / O. Trott, A. Olson // *J. Comput. Chem.* – 2010. – Vol. 31, № 2. – P. 455–461.
16. *Sanner, M.F.* Python: a programming language for software integration and development / M.F. Sanner // *J. Mol. Graph. Model.* – 1999. – Vol. 17, № 1. – P. 57–61.
17. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis / E.F. Pettersen [et al.] // *Journal of computational chemistry*. – 2004. – Vol. 25, № 13. – P. 1605–1612.
18. *Stierand, K.* Molecular complexes at a glance: automated generation of two-dimensional complex diagrams / K. Stierand, P.C. Maaß, M. Rarey // *Bioinformatics*. – 2006. – Vol. 22, № 14. – C. 1710–1716.
19. *Stierand, K.* Drawing the PDB: protein – ligand complexes in two dimensions / K. Stierand, M. Rarey // *ACS medicinal chemistry letters*. – 2010. – Vol. 1, № 9. – P. 540–545.
20. *Souza, P.C.T.* An alternative conformation of ER β bound to estradiol reveals H12 in a stable antagonist position / P.C.T. Souza, L.C. Textor, D.C. Melo // *Scientific reports*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 3509.

Куракин Георгий Федорович (контактное лицо) – студент 5-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России; 170100, Тверь, ул. Советская, д. 4. Тел. 8 (4822) 35-60-28; e-mail: Phyzyk@mail.ru.

УДК 616.1-07-08

Д.Ю. Платонов, С.Н. Бельдиев, И.В. Егорова, О.А. Лаздин, Е.И. Березина, Е.В. Андреева, И.В. Медведева, Г.Ю. Труфанова, С.А. Смирнов

ПЕРВЫЕ РОССИЙСКИЕ КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЕДЕНИЮ БОЛЬНЫХ С КОМОРБИДНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ: ОЦЕНИВАЕМ УРОВЕНЬ ДОКАЗАТЕЛЬНОСТИ

*Кафедра внутренних болезней, интернатуры и ординатуры ФДПО
ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России*

В статье обсуждаются некоторые положения российских клинических рекомендаций по ведению больных с коморбидной патологией (2017) с точки зрения уровня доказательности и соответствия клиническим рекомендациям авторитетных медицинских сообществ.

Ключевые слова: коморбидная патология, рациональная фармакотерапия, пропafenон, нитрендиптин, урсодезоксихолевая кислота, ребамипид.

FIRST RUSSIAN CLINICAL RECOMMENDATIONS FOR THE MANAGEMENT OF PATIENTS WITH COMORBID PATHOLOGY: EVALUATE THE EVIDENCE LEVEL

D.Ju. Platonov, S.N. Bel'diev, I.V. Egorova, O.A. Lazdin, E.I. Berezina, E.V. Andreeva, I.V. Medvedeva, G.Ju. Trufanova, S.A. Smirnov

Tver State Medical University

The article discusses some statements of Russian clinical guidelines for management of patients with comorbid disorders (2017) in terms of the level of evidence and compliance with the clinical guidelines of authoritative medical societies.

Key words: comorbid pathology, rational pharmacotherapy, propafenone, nitrendipine, ursodeoxycholic acid, rebamipide.