



<https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2022.142>

ISSN 2070-4909 (print)

ISSN 2070-4933 (online)

Биофизическое моделирование указывает на высокое сродство этиловых эфиров омега-3 полиненасыщенных жирных кислот к ферментам провоспалительного каскада арахидоновой кислоты

Торшин И.Ю., Громова О.А.

Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» Российской академии наук (ул. Вавилова, д. 44, корп. 2, Москва 119333, Россия)

Для контактов: Громова Ольга Алексеевна, e-mail: unesco.gromova@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ω -3 ПНЖК) широко используются в современной кардиологии. Противовоспалительный эффект эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) и докозагексаеновой кислоты (ДГК) осуществляется, в частности, за счет модуляции активности каскада арахидоновой кислоты (АРК).

Цель: провести биофизический анализ взаимодействий различных форм ПНЖК (АРК, ЭПК, ДГК, этиловые эфиры ЭПК и ДГК) с тремя целевыми белками – ферментами каскада АРК (циклооксигеназа-1 (ЦОГ-1), ЦОГ-2, 5-липоксигеназа (5-ЛПОГ)).

Материал и методы. Минимизацию энергии комплексов «лиганд–рецептор» при различных начальных расположениях молекулы относительно кармана рецептора и молекулярные энергетические профили белка (энергии переноса боковой цепи из растворителя в белок) вычисляли посредством пакета ECMMS.

Результаты. Этиловые эфиры ЭПК и ДГК характеризовались значительно большими абсолютными значениями энергий специфического связывания целевых белков, чем АРК или просто ЭПК/ДГК. Например, в случае ЦОГ-2 ЭПК, ДГК и этиловый эфир ЭПК имели близкие значения $\Delta\Delta G$ ($-3,0 \dots -3,1$ ккал/моль), в то время как комплекс ЦОГ-2 с этиловым эфиром ДГК был несколько более стабилен ($\Delta\Delta G = -3,4$ ккал/моль). В случае фермента 5-ЛПОГ наиболее стабильным был комплекс с этиловым эфиром ЭПК ($\Delta\Delta G = -1,62$ ккал/моль). Более высокие абсолютные значения энергий связывания указывают на более высокое сродство этиловых эфиров ЭПК и ДГК к ферментам каскада АРК.

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить, что высокое сродство этиловых эфиров ЭПК и ДГК к целевым белкам каскада АРК является одной из молекулярных основ терапевтической эффективности препаратов ω -3 ПНЖК с высокой степенью стандартизации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Аффинность к рецепторам, омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, ПНЖК, молекулярная фармакология.

Статья поступила: 11.05.2022 г.; в доработанном виде: 09.06.2022 г.; принята к печати: 30.06.2022 г.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии необходимости раскрытия конфликта интересов в отношении данной публикации.

Финансирование

Работа выполнялась по государственному заданию № 0063-2019-0003 «Математические методы анализа данных и прогнозирования» с использованием инфраструктуры Центра коллективного пользования «Высокопроизводительные вычисления и большие данные» ФИЦ ИУ РАН (г. Москва).

Вклад авторов

Авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Для цитирования

Торшин И.Ю., Громова О.А. Биофизическое моделирование указывает на высокое сродство этиловых эфиров омега-3 полиненасыщенных жирных кислот к ферментам провоспалительного каскада арахидоновой кислоты. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2022; 15 (2): xxx–xxx. <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2022.142>.

Biophysical modeling indicates a high affinity of ethyl esters of omega-3 polyunsaturated fatty acids to the enzymes of the pro-inflammatory arachidonic acid cascade

Torshin I.Yu., Gromova O.A.

Federal Research Center "Informatics and Management", Russian Academy of Sciences (44 corp. 2 Vavilov Str., Moscow 2119333, Russia)

Corresponding author: Olga A. Gromova, e-mail: unesco.gromova@gmail.com

SUMMARY

Background. Omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFAs) are widely used in modern cardiology. The anti-inflammatory effect of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) is realized, in particular, by modulating the activity of the arachidonic acid (ARA) cascade.

Objective: to conduct biophysical analysis of the interactions of various forms of PUFAs (ARA, EPA, DHA, EPA and DHA ethyl esters) with three target proteins-enzymes of the ARA cascade (cyclooxygenase-1 (COX-1), COX-2, 5-lipoxygenase (5-LPOG)).

Material and methods. The minimization of the energy of the ligand-receptor complexes at various initial positions of the molecule relative to the receptor pocket and the molecular energy profiles of the protein (the energy of side chain transfer from solvent to protein) were calculated using the ECMMS package.

Results. EPA and DHA ethyl esters were characterized by significantly higher absolute values of specific binding energies of target proteins than ARA or simply EPA/DHA. For example, in the case of COX-2, EPA, DHA and EPA ethyl ester had similar $\Delta\Delta G$ values ($-3.0...-3.1$ kcal/mol), while the COX-2 complex with DHA ethyl ester was somewhat more stable ($\Delta\Delta G = -3.4$ kcal/mol). In the case of the 5-LPOG enzyme, the complex with EPA ethyl ester was the most stable ($\Delta\Delta G = -1.62$ kcal/mol). Higher absolute binding energies indicate a higher affinity of EPA and DHA ethyl esters to enzymes of the ARA cascade.

Conclusion. The results suggest that the high affinity of EPA and DHA ethyl esters to the enzymes of the ARA cascade is one of the molecular bases of therapeutic efficacy of ω -3 PUFAs with high degree of standardization.

KEYWORDS

Receptor affinity, omega-3 polyunsaturated fatty acids, PUFAs, molecular pharmacology.

Received: 11.05.2022; **in the revised form:** 09.06.2022; **accepted:** 30.06.2022

Conflict of interests

The authors declare they have nothing to disclose regarding the conflict of interests with respect to this manuscript.

Funding

The research was conducted under the government contract No. 0063-2019-0003 "Mathematical methods of data analysis and forecasting" using the infrastructure of the Shared Research Facilities "High Performance Computing and Big Data" of Federal Research Center "Informatics and Management", Russian Academy of Sciences (Moscow).

Authors' contribution

The authors contributed equally to this article.

For citation

Torshin I.Yu., Gromova O.A. Biophysical modeling indicates a high affinity of ethyl esters of omega-3 polyunsaturated fatty acids to the enzymes of the pro-inflammatory arachidonic acid cascade. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoeconomika i farmakoepidemiologiya* / *FARMAKOEKONOMIKA. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*. 2022; 15 (2): xxx-xxx (in Russ.). <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2022.142>.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Увеличение потребления омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (ω -3 ПНЖК) достоверно ассоциировано с дозозависимым снижением смертности от всех причин [1]. Детальный аудит доказательных публикаций по ω -3 ПНЖК, проведенный посредством современных математических методов анализа больших данных [2], подтвердил существование обширной клинической базы, указывающей на обоснованность использования стандартизированных препаратов на основе ω -3 ПНЖК для снижения сердечно-сосудистой смертности.

Аудит доказательных публикаций [2] указал на необходимость изучения количественного состава препаратов на основе ω -3 ПНЖК. Сравнительное исследование состава 10 образцов ω -3 ПНЖК с хроматографическим определением более 40 метаболитов

жирных кислот и других соединений позволило разработать количественные маркеры для идентификации более стандартизированных образцов ω -3 ПНЖК – «эйкозапентаеновая кислота (ЭПК) + докозагексаеновая кислота (ДГК)», « ω -6 + ω -11», коэффициент стандартизации и др. [3].

Анализ количественного и качественного состава фармацевтических образцов ω -3 ПНЖК показал, что в них входят разные формы ω -3 ПНЖК (триглицериды, карбоновые кислоты, этиловые эфиры) (рис. 1, а). Каждая из этих форм имеет химические особенности, отражающиеся на их фармакологических свойствах. Молекулы триглицеридов (сложные эфиры с глицерином) достаточно громоздки: остаток глицерина – многоатомный спирт, он включает три гидроксильные ($-OH$) группы (рис. 1, б). Для взаимодействия с целевыми белками триглицериды должны

Основные моменты

Что уже известно об этой теме?

- ▶ Стандартизированные препараты на основе омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (ω -3 ПНЖК), воздействующие на синтез эйкозаноидов и докозаноидов в каскаде арахидоновой кислоты (АРК), успешно используются в терапии сердечно-сосудистых заболеваний
- ▶ Препараты ω -3 ПНЖК существенно различаются по количественному и качественному составу
- ▶ Анализы состава препаратов указывают на перспективы применения сложных эфиров ω -3 ПНЖК

Что нового дает статья?

- ▶ Сложные эфиры ω -3 ПНЖК характеризуются значительно большими энергиями специфического связывания ферментов каскада АРК, чем свободные формы ПНЖК
- ▶ Абсолютные значения энергии связывания сложных эфиров ω -3 ПНЖК с целевыми белками (циклооксигеназы, липоксигеназа) возрастают с увеличением длины цепи сложного эфира
- ▶ Более высокие значения энергий связывания указывают на более высокое сродство сложных эфиров эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) и докозагексаеновой кислоты (ДГК) к целевым белкам

Как это может повлиять на клиническую практику в обозримом будущем?

- ▶ Более стабильные комплексы с целевыми белками соответствуют более интенсивному образованию противовоспалительных эйкозаноидов из ω -3 ПНЖК
- ▶ Препараты, содержащие сложные эфиры ω -3 ПНЖК, могут более эффективно взаимодействовать с различными ферментами, чем препараты, содержащие только ω -3 ПНЖК
- ▶ Более высокое сродство сложных эфиров ЭПК и ДГК к целевым белкам каскада АРК может повышать терапевтическую эффективность соответствующих препаратов

Highlights

What is already known about the subject?

- ▶ Standardized drugs based on omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFAs), which affect the synthesis of eicosanoids and docosanoids in the arachidonic acid (ARA) cascade, are successfully used in the treatment of cardiovascular diseases
- ▶ Medicines of ω -3 PUFAs differ significantly in quantitative and qualitative composition
- ▶ Analyses of the composition of medicines indicate the prospects for the use of ω -3 PUFA esters

What are the new findings?

- ▶ ω -3 PUFA esters are characterized by significantly higher specific binding energies for the enzymes of the ARA cascade than free forms of PUFAs
- ▶ The absolute values of the binding energy of ω -3 PUFA esters with target proteins (cyclooxygenases, lipoxygenase) increase with increasing the ester chain length
- ▶ Higher binding energies indicate a higher affinity of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) esters to target proteins

How might it impact the clinical practice in the foreseeable future?

- ▶ More stable complexes with target proteins correspond to more intense formation of anti-inflammatory eicosanoids from ω -3 PUFAs
- ▶ Medicines containing ω -3 PUFA esters may interact more effectively with various enzymes than medicines containing only ω -3 PUFAs
- ▶ The higher affinity of EPA and DHA esters to target proteins of the ARA cascade may increase the therapeutic efficacy of the respective medicines

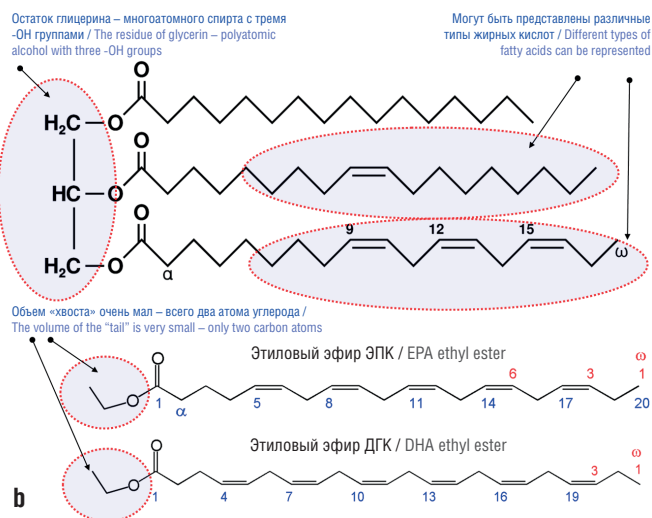
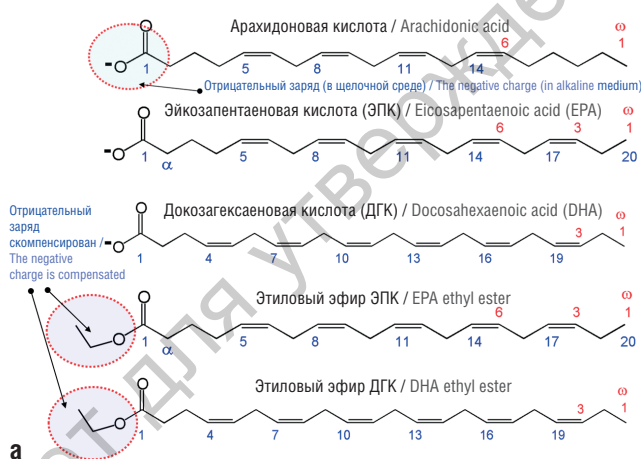


Рисунок 1. Полиненасыщенные жирные кислоты и их производные, изученные в настоящем исследовании:

а – химические структуры; б – сравнение структур триглицеридов и этиловых эфиров

Figure 1. The studied polyunsaturated fatty acids and their derivatives:

а – chemical structures; б – comparison of the structures of triglycerides and ethyl esters

предварительно гидролизуются до свободных ПНЖК, что неизбежно сказывается на фармакокинетике образцов ω -3 ПНЖК, содержащих триглицериды.

Свободные ПНЖК, как правило, представлены в организме в диссоциированной форме и характеризуются отрицательным

зарядом в карбоксильной группе ($-\text{COO}^-$). Заряд карбоксилата меняется в зависимости от pH и может воспрепятствовать взаимодействию с целевыми белками. Этиловые эфиры, в отличие от триглицеридов, могут взаимодействовать с целевыми белками без предварительного гидролиза эфира до ПНЖК и спирта

(см. рис. 1, b). В отличие от свободных жирных кислот в этиловых эфирах ω -3 ПНЖК некомпенсированный отрицательный заряд карбоксильной группы отсутствует.

Приведенные выше аргументы носят качественный характер, так что их следует дополнить количественными оценками взаимодействия рассматриваемых молекул с целевыми белками. Как известно, ω -3 ПНЖК характеризуются значительными противовоспалительными и вазодилаторными свойствами в связи с их влиянием на метаболизм простагландинов через каскад арахидоновой кислоты (АРК) [4]. В ходе биотрансформаций в каскаде АРК ПНЖК трансформируются циклооксигеназами (ЦОГ) в простаиноиды (простагландины, простациклины, тромбоксаны), а посредством липоксигеназ (ЛПОГ) – в лейкотриены. В отличие от АРК ω -3 ПНЖК и их производные проявляют гораздо меньшее провоспалительное действие – наоборот, предотвращают синтез провоспалительных простаиноидов [5, 6] и способствуют синтезу противовоспалительных [7], нейропротекторных [8] и вазодилаторных простаиноидов [9]. Более того, ω -3 ПНЖК необходимы для биосинтеза медиаторов разрешения воспаления – резолвинов, нейропротектинов, маресинов и др. [10].

Как видно из приведенного выше краткого экскурса в биохимию ω -3 ПНЖК, наиболее важными белками – рецепторами ω -3 ПНЖК являются ЦОГ и ЛПОГ. Взаимодействия различных форм ω -3 ПНЖК перспективно исследовать именно с этими ферментами. Расчет значений энергий взаимодействия исследуемых целевых молекул с вышеупомянутыми целевыми белками ранее не проводился. Оценка сродства различных форм ПНЖК к этим целевым белкам позволяет выявить те формы ω -3, от которых следует ожидать наибольшего терапевтического эффекта.

Цель – провести биофизический анализ взаимодействий различных форм ПНЖК (АРК, ЭПК, ДГК, этиловые эфиры ЭПК и ДГК) с тремя целевыми белками – ферментами каскада АРК (ЦОГ-1, ЦОГ-2, 5-ЛПОГ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ / MATERIAL AND METHODS

Исследование проводилось современными методами биофизического моделирования и биоинформатики, включающими расчет энергий взаимодействий в комплексах «молекула–рецептор».

Химические структуры исследованных ПНЖК приведены на рисунке 1. Выбор молекул для исследования очевиден: АРК – основной субстрат каскада АРК, ЭПК и ДГК – формы «морских» ω -3 ПНЖК с наибольшей базой клинико-эпидемиологических исследований. Этиловые эфиры ДГК и ЭПК – действующие начала препарата ω -3 ПНЖК, который характеризуется наибольшей доказательной базой среди препаратов ω -3 ПНЖК.

В работе исследовались взаимодействия этих ПНЖК с ЦОГ-1, ЦОГ-2 и 5-ЛПОГ. Модели пространственных структур указанных ферментов были приготовлены на основе структур, имеющихся в базе данных Protein Data Bank (PDB)¹, содержащей все известные к настоящему времени структуры белков, определенные посредством дифракционных экспериментов или ядерного магнитного резонанса (табл. 1). Структуры из PDB были отобраны с учетом: 1) наличия в соответствующих файлах информации о сайтах связывания лигандов (жирных кислот и коферментов); 2) качества эксперимента по установлению пространственной структуры. В случае ЦОГ коферментами являлись протопорфирин с ионом кобальта, а в случае 5-ЛПОГ – ион трехвалентного железа.

На основе отобранных из базы данных PDB-файлов были приготовлены модели структур ферментов человека (методика опи-

Таблица 1. Используемые в исследовании файлы базы данных Protein Data Bank (PDB) по пространственным структурам ферментов каскада арахидоновой кислоты

Table 1. The Protein Data Bank (PDB) database files on the spatial structures of enzymes of the arachidonic acid cascade used in the study

Фермент / Enzyme	PDB-файлы / PDB-files
Циклооксигеназа-1 / Cyclooxygenase-1	1diy 1igx
Циклооксигеназа-2 / Cyclooxygenase-2	3hs5 3hs6 3hs7
5-липоксигеназа / 5-lipoxygenase	1ik3

сана в [11]). Затем были исследованы возможности размещения молекул ω -3 ПНЖК в связывающих карманах ферментов. Для этого проводилась минимизация энергии комплексов «лиганд–рецептор» при различных начальных расположениях молекулы относительно кармана рецептора.

Метод молекулярных энергетических профилей / The method of molecular energy profiles

В данной работе для анализа структур комплексов ферментов с ПНЖК использовался метод молекулярных энергетических профилей. Молекулярные энергетические профили являются новой концепцией в биоинформатике и биофизике белка. Они используются для определения аминокислотных остатков в структуре белка, которые обладают экстремальными (наиболее высокими или наиболее низкими) значениями энергии переноса боковой цепи из растворителя в белок ($\Delta G_{\text{ост}}$). Остатки с экстремальными значениями $\Delta G_{\text{ост}}$ часто являются наиболее важными для реализации биологических функций белка [11].

Молекулярные энергетические профили представляет собой список значений $\Delta G_{\text{ост}}$ для каждого остатка в белке. Список упорядочен в соответствии с порядковыми номерами остатков в аминокислотной последовательности белка-рецептора. Для заданной трехмерной структуры белка значения $\Delta G_{\text{ост}}$ рассчитываются с использованием методов классической молекулярной механики. Процедура расчета состоит из двух этапов: минимизации энергии молекулярной системы и собственно расчета $\Delta G_{\text{ост}}$. Ниже приводится детальное описание этого вычислительного метода.

Минимизация энергии

Минимизация полной энергии осуществлялась посредством алгоритмической комбинации, которая включает перемежающиеся стадии минимизации энергии посредством конъюгированных градиентов и коротких периодов молекулярной динамики. Подобного рода комбинация (названная «интерактивной оптимизацией») позволяет избежать «застывания» системы в локальных минимумах. Интерактивная оптимизация является итеративной процедурой. Один цикл минимизации состоит из 50...200 шагов минимизации конъюгированных градиентов, за которой следует 100...1000 фемтосекунд молекулярной динамики. Применение метода конъюгированных градиентов в молекулярной механике заключается в смещении каждого атома в направлении действующей на этот атом сил. Для молекулы из N атомов сила, действующая на каждый атом, определяется как:

$$\vec{F}(\vec{x}_j) = -\vec{\nabla}_{x_j} U_{\text{полн}},$$

где $U_{\text{полн}}$ – полная внутренняя энергия молекулярной системы, $j = 1...N$.

¹ www.rcsb.org.

Для i -го шага минимизации по конъюгированным градиентам новые координаты каждого атома определяются как:

$$\vec{x}_j^i = \vec{x}_j^{i-1} + k \times \vec{h}_j^i,$$

$$\vec{h}_j^i = \vec{F}(\vec{x}_j^i) + \frac{|\vec{F}(\vec{x}_j^i)|^2}{|\vec{F}(\vec{x}_j^{i-1})|^2} \vec{h}_j^{i-1}.$$

$U_{\text{полн}}$ молекулярной системы, содержащей N атомов, B ковалентных связей (связывающих термов), A угловых термов и T торсионных термов, определяется как:

$$U_{\text{полн}} = \sum_{j=1}^B E_{\text{связ}}^j + \sum_{j=1}^A E_{\text{угл}}^j + \sum_{j=1}^T E_{\text{торс}}^j + \sum_{j=1}^N \sum_{k=j+1}^N E_{\text{несвяз}}^{j,k},$$

$$E_{\text{связ}}^j = \frac{1}{2} K_b^j (r^j - r_0^j)^2,$$

$$E_{\text{угл}}^j = \frac{1}{2} K_\theta^j (\theta^j - \theta_0^j)^2,$$

$$E_{\text{торс}}^j = \frac{1}{2} \sum_{m=1}^n V_m^j (1 + \cos(m\varphi^j - \varphi_0^j)),$$

где $E_{\text{связ}}^j$ – терм энергии j -й ковалентной связи; $E_{\text{угл}}^j$ – терм энергии j -го углового изгиба двух ковалентных связей; $E_{\text{торс}}^j$ – терм энергии вращения j -го диэдрального угла.

Терм несвязывающих взаимодействий определяется как сумма электростатического и Ван-дер-Ваальсового термов:

$$E_{\text{несвяз}}^{j,k} = E_{\text{эл}}^{j,k} + E_{\text{ВДВ}}^{j,k}.$$

Электростатические взаимодействия описываются законом Кулона:

$$E_{\text{эл}}^{j,k} = q_j q_k / 4\pi\epsilon_0 r_{j,k},$$

а Ван-дер-Ваальсовы – посредством потенциала Леннарда–Джонса:

$$E_{\text{ВДВ}}^{j,k} = -\frac{B_{jk}}{r_{jk}^6} + \frac{A_{jk}}{r_{jk}^{12}}.$$

Силовые константы K_b , K_θ , V_m , равновесные значения связей и углов r_0 , θ_0 , φ_0 , а также константы A_{jk} , B_{jk} определены в соответствии с потенциалом UFF. Значения частичных атомных зарядов q_j , q_k определены на основе потенциала AMBER при составлении которого использовались квантово-механические расчеты. Вычисления проводили посредством пакета EMMMS [10].

Молекулярная динамика

Процедура молекулярной динамики основана на втором законе Ньютона:

$$\vec{F}(\vec{x}_j) = m_j \vec{a}_j = m_j \dot{\vec{V}}_j(t),$$

$$\vec{V}_j(t) = \dot{\vec{x}}_j(t).$$

Значения ускорений a_j индивидуальных атомов находятся на основе $U_{\text{полн}}$ (см. выше), а затем численно интегрируются с исполь-

зованием алгоритма Верле. Скорости и координаты в следующий момент времени $t + \Delta t$:

$$\vec{x}(t + \Delta t) = \vec{x}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + 0,5\vec{a}(t)(\Delta t)^2,$$

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + 0,5\Delta t(\vec{a}(t) + \vec{a}(t + \Delta t)).$$

Начальные скорости атомов были рандомизированы в соответствии с распределением Максвелла:

$$D(v) = (m / 2\pi kT)^{3/2} 4\pi v^2 e^{-mv^2 / 2kT}.$$

Температура системы фиксировалась в соответствии с равенством:

$$\frac{1}{2} \sum_{j=1}^N m_j V_j^2 = \frac{3}{2} N k_B T.$$

Для расчетов использовались $T = 300\text{K}$ и $\epsilon = 1$.

Расчет энергий переноса

Расчеты энергий переноса боковой цепи из растворителя в белок ($\Delta G_{\text{ост}}$) проводили на основе несвязывающего потенциала, определяемого на основании вышеприведенных уравнений молекулярной механики и терма энергии сольватации. Таким образом, $\Delta G_{\text{ост}}$ i -го аминокислотного остатка, состоящего из k атомов:

$$\Delta G_{\text{ост}}^i = \Delta E_{\text{несвяз}}^i + \Delta \Delta G_{\text{сольв}}^i.$$

В данном случае $\Delta E_{\text{несвяз}}^i$ представляет собой разность между несвязывающей энергией взаимодействия атомов аминокислотного остатка со всеми атомами белка и энергией взаимодействия атомов внутри аминокислотного остатка:

$$\Delta E_{\text{несвяз}}^i = E_{\text{несв,белок}}^i - E_{\text{несв,вакк}}^i \times E_{\text{несв,белок}}^i$$

и определяется как:

$$E_{\text{несв,белок}}^i = \sum_{j=1}^k \sum_{m=1, m \neq j}^N (E_{\text{эл}}^{j,m} + E_{\text{ВДВ}}^{j,m}),$$

$$E_{\text{несв,вакк}}^i = \sum_{j=1}^k \sum_{m=j+1}^k (E_{\text{эл}}^{j,m} + E_{\text{ВДВ}}^{j,m}),$$

где $j = 1...k$ соответствует суммированию по атомам i -го аминокислотного остатка [10].

$\Delta \Delta G_{\text{сольв}}^i$ вычислялась как разность между термами сольватации внутри и вне белка:

$$\Delta \Delta G_{\text{сольв}}^i = \sum_{j=1}^k \delta_j \Delta S A_j,$$

где δ_j – атомный сольватационный параметр, полученный на основании экспериментов по определению LogP в системе «октанол–вода», а $\Delta S A_j$ – изменение доступности поверхности растворителю при переносе остатка из вакуума в белок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ / RESULTS AND DISCUSSION

Получены полноатомные пространственные структуры комплексов исследованных молекул с таргетными белками. Затем проведен расчет энергий связывания и измерены молекулярные энергетические профили. В последующих разделах полученные результаты расчетов предваряются краткими введениями по биологии соответствующих ферментов.

Основным параметром, позволяющим оценить сродство той или иной молекулы к определенному белку-рецептору, является $\Delta\Delta G$ – изменение свободной энергии (ΔG) образования комплекса «молекула–рецептор» минус изменение свободной энергии молекулы рецептора при отсутствии связанного лиганда. Для стабильных комплексов значения $\Delta\Delta G$ отрицательны. Чем меньше значение $\Delta\Delta G$ (т.е. чем больше абсолютное значение $\Delta\Delta G$), тем больше стабильность комплекса и тем выше сродство соответствующего лиганда к целевому белку.

Результаты расчетов $\Delta\Delta G$ комплексов «лиганд–белок» / Results of calculations of ligand-protein complexes $\Delta\Delta G$

В таблице 2 и на рисунке 2 суммированы результаты расчетов $\Delta\Delta G$ по всем вычислительным экспериментам, проведенным в ходе исследования. Как видно из расчета энергий связывания, ω -3 ПНЖК и их производные характеризовались большими по сравнению с АРК абсолютными значениями энергий связывания $\Delta\Delta G$ с белками-рецепторами.

Циклооксигеназы-1 и -2: основные ферменты синтеза простагландинов / Cyclooxygenases-1 and -2: the main enzymes of prostaglandin synthesis

Существует две разновидности циклооксигеназ (также известных как простагландин H2 синтетазы) – ЦОГ-1 и ЦОГ-2. Обе разновидности на 65% идентичны по аминокислотной последователь-

ности и практически идентичны по пространственной структуре. Ткани организма отличаются друг от друга по уровням экспрессии ЦОГ-1 и ЦОГ-2. ЦОГ-1 экспрессируется в большинстве клеток и является необходимым ферментом для биосинтеза простагландинов. ЦОГ-2 – индуцибельный фермент, который экспрессируется в активированных макрофагах и других клетках при воспалении.

Результаты расчета энергий связывания (см. рис. 2) показывают, что ЭПК, ДГК и их этиловые эфиры характеризуются более высокими абсолютными значениями энергий связывания с ЦОГ-1 и ЦОГ-2 по сравнению с ω -6 АРК. За исключением комплекса ЭПК–ЦОГ-1, энергии связывания ЭПК и ДГК на 0,4...1,8 ккал/моль превышали абсолютные значения энергии стабилизации комплексов АРК–ЦОГ-1 и АРК–ЦОГ-2. В случае ЦОГ-2 ЭПК, ДГК и этиловый эфир ЭПК характеризовались близкими значениями $\Delta\Delta G$ (–3,0...–3,1 ккал/моль), в то время как комплекс ЦОГ-2 с этиловым эфиром ДГК был несколько более стабилен ($\Delta\Delta G$ = –3,4 ккал/моль).

Анализ молекулярно-энергетических профилей (рис. 3) показал, что этот выигрыш в энергии стабилизации комплексов обусловлен не изменениями в характере взаимодействий каких-либо отдельных аминокислотных остатков, а более эффективной (по сравнению с АРК) аккомодацией молекул ω -3 ПНЖК и их производных в структуре целевых белков ЦОГ-1 и ЦОГ-2.

Анализ молекулярно-энергетических профилей, представленных на рисунке 3, позволил сделать вывод, что более высокая

Таблица 2. Энергии связывания исследованных молекул полиненасыщенных жирных кислот с ферментами каскада арахидоновой кислоты, ккал/моль

Table 2. Binding energies of the studied polyunsaturated fatty acids molecules with enzymes of the arachidonic acid cascade, kcal/mol

Фермент / молекула ПНЖК // Enzyme / PUFA-molecule	Циклооксигеназа-1 / Cyclooxygenase-1	Циклооксигеназа-2 / Cyclooxygenase-2	5-липоксигеназа / 5-lipoxygenase
АРК / ARA	–1,65	–2,44	–0,69
ЭПК / EPA	–1,01	–3,02	–0,95
ДГК / DHA	–2,67	–3,00	–1,21
Этиловый эфир ЭПК / EPA ethyl ester	–3,42	–3,10	–1,62
Этиловый эфир ДГК / DHA ethyl ester	–3,34	–3,42	–1,23

Примечание. ПНЖК – полиненасыщенная жирная кислота; АРК – арахидоновая кислота; ЭПК – эйкозапентаеновая кислота; ДГК – докозагексаеновая кислота. Расчет был проведен на основе подготовленных моделей комплексов «ПНЖК–белок». Приведены значения относительных энергий образования комплекса «молекула–рецептор». Жирным шрифтом выделены молекулы с наименьшими значениями энергий связывания (т.е. с наибольшим сродством к целевым белкам).

Note. PUFA – polyunsaturated fatty acid; ARA – arachidonic acid; EPA – eicosapentaenoic acid; DHA – docosahexaenoic acid. The calculation was carried out on the basis of the prepared models of PUFA-protein complexes. Values of relative energies of formation of the molecule-receptor complex are given. Molecules with the lowest binding energies (i.e., with the highest affinity to target proteins) are highlighted in bold.

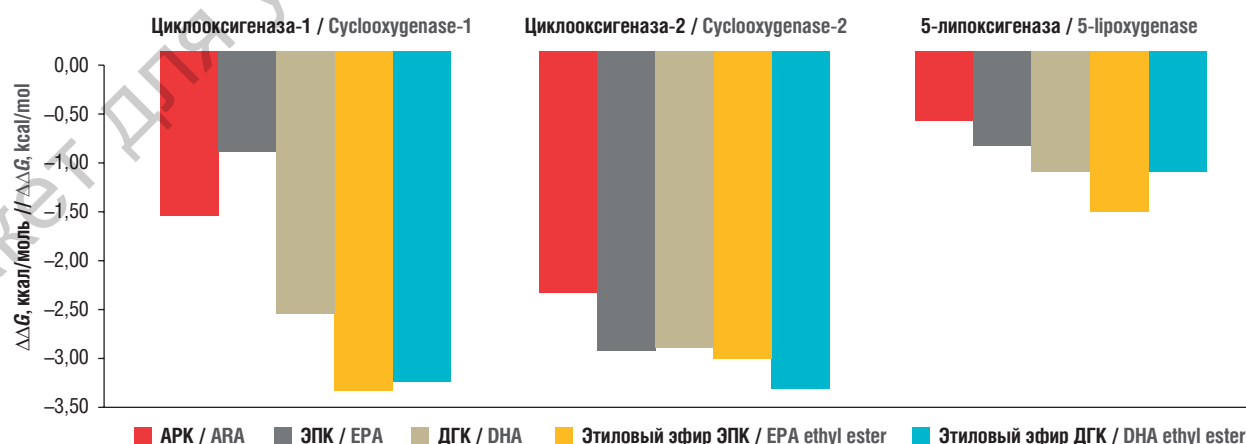


Рисунок 2. Энергии связывания исследованных молекул полиненасыщенных жирных кислот с ферментами каскада арахидоновой кислоты.

АРК – арахидоновая кислота; ЭПК – эйкозапентаеновая кислота; ДГК – докозагексаеновая кислота

Figure 2. Binding energies of the studied polyunsaturated fatty acids molecules with the enzymes of the arachidonic acid cascade.

ARA – arachidonic acid; EPA – eicosapentaenoic acid; DHA – docosahexaenoic acid

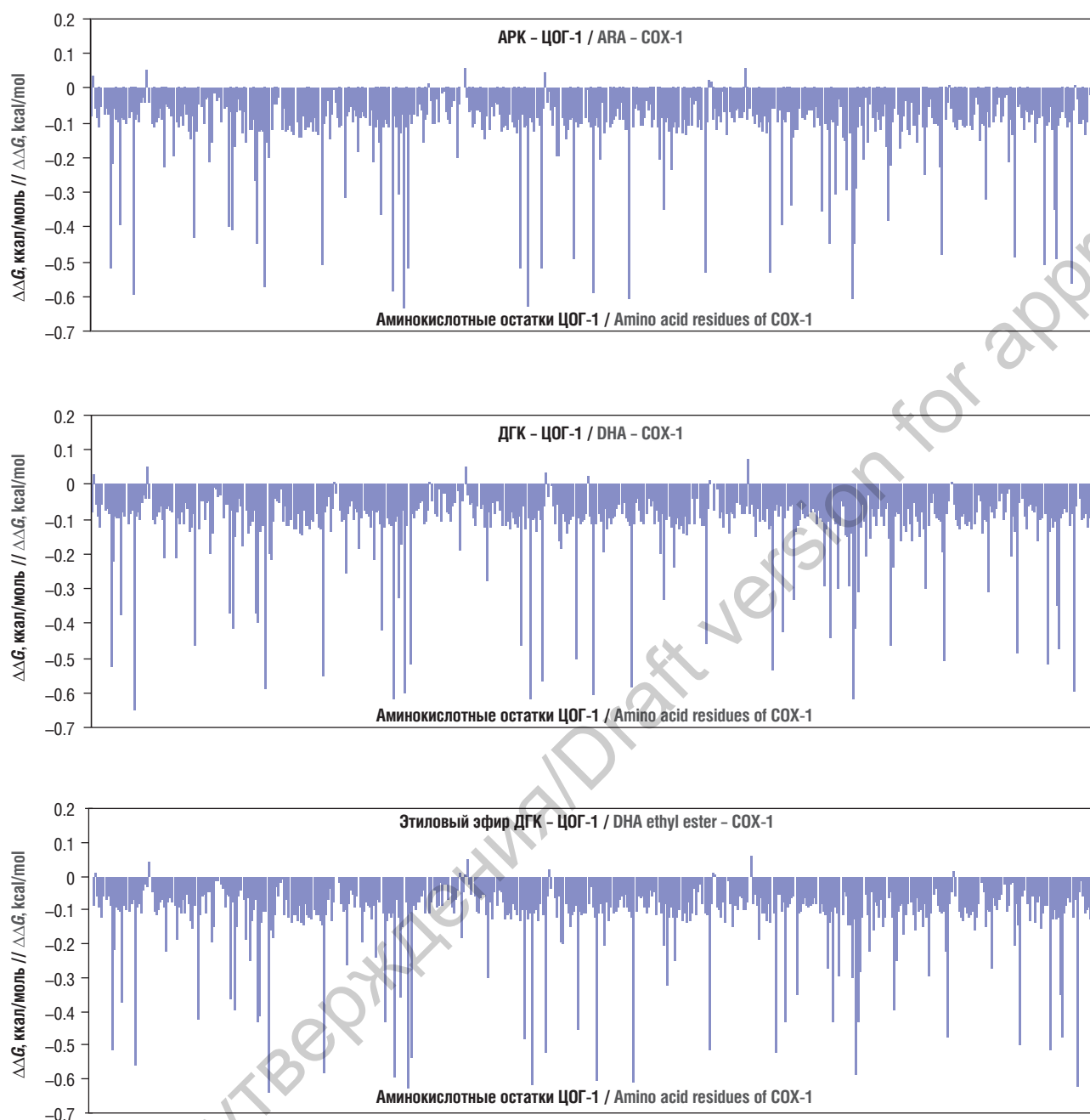


Рисунок 3. Молекулярно-энергетические профили комплексов полиненасыщенных жирных кислот с циклооксигеназой-1 (ЦОГ-1): а – комплекс арахидоновой кислоты (АРК) с ЦОГ-1; б – комплекс докозагексаеновой кислоты (ДГК) с ЦОГ-1; в – комплекс этилового эфира ДГК с ЦОГ-1

Figure 3. Molecular energy profiles of polyunsaturated fatty acids complexes with cyclooxygenase-1 (COX-1): а – arachidonic acid (ARA) with COX-1; б – docosahexaenoic acid (DHA) with COX-1; в – DHA ethyl ester with COX-1

стабильность структур этиловых эфиров ЭПК и ДГК обусловлена взаимодействиями этилового «хвоста» с гидрофобным карманом в структуре ЦОГ (рис. 4). Например, в структуре ЦОГ-1 гидрофобный карман сформирован аминокислотами валин-116, аргинин-120, аланин-527, лейцин-531. Этиловый «хвост» молекулы эфира увеличивает площадь ее поверхности по сравнению со свободной ПНЖК, тем самым увеличивая площадь поверхности взаимодействия этиловых эфиров ЭПК и ДГК с рецептором. Поскольку взаимодействия гидрофобные, увеличение площади взаимодействия молекул с ЦОГ приводит к увеличению стабильности комплексов «лиганд–ЦОГ».

Арахидонат 5-липоксигеназа: основной фермент биосинтеза лейкотриенов / Arachidonate 5-lipoxygenase: the main enzyme of leukotriene biosynthesis

Арахидонат 5-ЛПОГ (ген *Allox5*) преобразует ПНЖК в лейкотриены. Липоксигеназный путь синтеза лейкотриенов существует в различных лейкоцитах, включая мастоциты (тучные клетки), эозинофилы, нейтрофилы, моноциты и базофилы. Трансформации АРК посредством 5-ЛПОГ приводят к образованию провоспалительных лейкотриенов 4-й группы (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄). При действии 5-ЛПОГ на ЭПК синтезируются противовоспалительные лейкотриены 5-й группы (LTB₅, LTC₅, LTD₅, LTE₅).

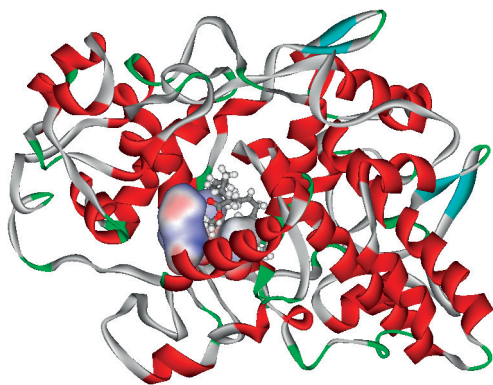


Рисунок 4. Пространственная структура комплекса этилового эфира эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) с циклооксигеназой-2 (ЦОГ-2). Показан гидрофобный карман, в котором расположен этиловый «хвост» молекулы. Структура комплекса ЭПК с ЦОГ-1 практически идентична

Figure 4. Spatial structure of the complex of eicosapentaenoic acid (EPA) ethyl ester with cyclooxygenase-2 (COX-2). A hydrophobic pocket is shown, in which the ethyl "tail" of the molecule is located. The structure of the EPA with COX-1 complex is almost identical

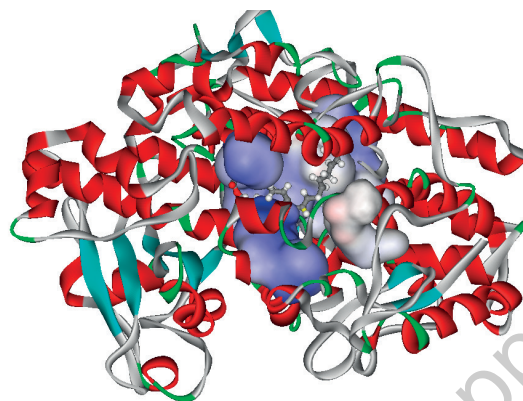


Рисунок 5. Пространственная структура комплекса этилового эфира эйкозапентаеновой кислоты с 5-липоксигеназой. Показан гидрофобный карман связывания молекулы омега-3 полиненасыщенной жирной кислоты

Figure 5. Spatial structure of the eicosapentaenoic acid ethyl ester complex with 5-lipoxygenase. Hydrophobic binding pocket of omega-3 polyunsaturated fatty acid molecule is shown

Расчеты, представленные в настоящей работе, показывают, что комплексы ω -3 ПНЖК с 5-ЛПОГ намного более стабильны ($\Delta\Delta G = -0,95...-1,62$ ккал/моль), чем комплекс АРК с 5-ЛПОГ ($\Delta\Delta G = -0,69$ ккал/моль). Наиболее стабильным был комплекс 5-ЛПОГ с этиловым эфиром ЭПК ($\Delta\Delta G = -1,62$ ккал/моль). Анализ молекулярно-энергетических профилей комплексов 5-ЛПОГ с ДГК и этиловым эфиром ДГК продемонстрировал, что обе молекулы имеют близкие значения энергии связывания ($\Delta\Delta G = -1,21...-1,23$ ккал/моль) вследствие сравнительно малого объема связывающего сайта ПНЖК в структуре фермента 5-ЛПОГ.

Меньший объем сайта связывания ДГК приводит к тому, что добавление этилового «хвоста» не только обеспечивает увеличение поверхности взаимодействия с белком-рецептором, но и усиливает стерические препятствия (пространственные напряжения) в структуре фермента. Поэтому увеличение поверхности молекулы этилового эфира ДГК компенсируется возрастанием стерических препятствий, так что не происходит значительного увеличения энергии связывания с 5-ЛПОГ. В то же время объем молекулы ЭПК меньше, чем объем ДГК на $5...10 \text{ \AA}^3$, поэтому этиловый эфир ЭПК образует более стабильный комплекс с 5-ЛПОГ (рис. 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ / CONCLUSION

В работе представлены результаты биофизического анализа взаимодействий АРК, ЭПК, ДГК и этиловых эфиров ЭПК и ДГК с ЦОГ-1/2 и 5-ЛПОГ. Исследование привело к нескольким выводам, весьма интересным с точки зрения молекулярной фармакологии ЭПК и ДГК.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Li W.L., Zhang N.H., Ge S.W., Xu G. Dietary omega-3 fatty acid intake and mortality in CKD population: a 1999–2014 NHANES analysis. *Am J Nephrol.* 2021; 52 (12): 909–18. <https://doi.org/10.1159/000520027>.
2. Торшин И.Ю., Громова О.А., Кобалава Ж.Д. О репрессиях ω -3 полиненасыщенных жирных кислот адипатами доказательной медицины. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология.* 2019; 12 (2): 91–114. <https://doi.org/10.17749/2070-4909.2019.12.2.91-114>.

Во-первых, ЭПК и ДГК могут образовывать намного более стабильные комплексы с ферментами ЦОГ-1/2 и 5-ЛПОГ, чем АРК. С одной стороны, этот результат соответствует вытеснению АРК из активных центров целевых ферментов, что приводит к замедлению образования провоспалительных эйкозаноидов. С другой стороны, более стабильные комплексы с целевыми белками соответствуют более интенсивному образованию противовоспалительных эйкозаноидов из ЭПК и ДГК.

Во-вторых, этиловые эфиры ЭПК и ДГК образуют более стабильные комплексы с ферментами каскада АРК, чем свободные ЭПК и ДГК. Результаты биофизического моделирования показали, что это обусловлено увеличением площади поверхности молекулы при присоединении этилового «хвоста» в составе сложных эфиров ЭПК и ДГК.

В-третьих, разница в молекулярном объеме между ЭПК и ДГК (ЭПК – меньший объем, ДГК – больший объем) и их этиловыми эфирами обеспечивает разницу в связывании белками-рецепторами с различными объемами сайта связывания лигандов. Например, более объемный этиловый эфир ДГК лучше связывается с большим сайтом в ферментах ЦОГ-1/2, а этиловый эфир ЭПК с меньшим объемом лучше связывается с меньшим по объему сайтом связывания 5-ЛПОГ. Поэтому препараты, содержащие этиловые эфиры и ЭПК, и ДГК, могут более эффективно взаимодействовать с различными ферментами, чем препараты, содержащие этиловые эфиры только ЭПК или только ДГК.

Большее сродство этиловых эфиров ЭПК и ДГК к молекулам ферментов каскада АРК является одной из фундаментальных основ высокой терапевтической эффективности препаратов ω -3 ПНЖК с высокой степенью стандартизации.

3. Торшин И.Ю., Громова О.А., Зайчик Б.Ц., Ружицкий А.О. Комплексное исследование состава экстрактов жира рыб и количественные критерии для различения стандартизированных экстрактов омега-3 полиненасыщенных жирных кислот. *Кардиология.* 2020; 60 (5): 47–56. <https://doi.org/10.18087/cardio.2020.5.n1053>.
4. Simopoulos A.P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr.* 2002; 21 (6): 495–505. <https://doi.org/10.1080/07315724.2002.10719248>.

5. González-Pérez A., Planagumà A., Gronert K., et al. Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J.* 2006; 20 (14): 2537–9. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6250fje>.
6. Khalfoun B., Thibault F., Watier H., et al. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 400B: 589–97.
7. Wada M., DeLong C.J., Hong Y.H., et al. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem.* 2007; 282 (31): 22254–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703169200>.
8. Serhan C.N., Chiang N., Van Dyke T.E. Resolving inflammation: dual

- anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8 (5): 349–61. <https://doi.org/10.1038/nri2294>.
9. Mori T.A. Omega-3 fatty acids and blood pressure. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2010; 56 (1): 83–92.
10. Serhan C.N., Libreros S., Nshimiyimana R. E-series resolvins: metabolome, biosynthesis and critical role of stereochemistry of specialized pro-resolving mediators (SPMs) in inflammation-resolution: preparing SPMs for long COVID-19, human clinical trials, and targeted precision nutrition. *Semin Immunol.* 2022: 101597. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2022.101597>.
11. Torshin I.Yu. Bioinformatics in the post-genomic era: the role of biophysics. NY: Nova Science Publishers; 2013: 255 pp.

REFERENCES:

1. Li W.L., Zhang N.H., Ge S.W., Xu G. Dietary omega-3 fatty acid intake and mortality in CKD population: a 1999–2014 NHANES analysis. *Am J Nephrol.* 2021; 52 (12): 909–18. <https://doi.org/10.1159/000520027>.
2. Torshin I.Yu., Gromova O.A., Kobalava Zh.D. Concerning the “repression” of ω -3 polyunsaturated fatty acids by adepts of evidence-based medicine. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoeconomika i farmakoepidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology.* 2019; 12 (2): 91–114. (in Russ.). <https://doi.org/10.17749/2070-4909.2019.12.2.91-114>.
3. Torshin I.Yu., Gromova O.A., Zaychik B.Ts., Ruzhitsky A.O. Comprehensive study of the composition of fish fat extracts and quantitative criteria for distinguishing standardized omega-3 polyunsaturated fatty acids extracts. *Kardiologiya.* 2020; 60 (5): 47–56 (in Russ.). <https://doi.org/10.18087/cardio.2020.5.n1053>.
4. Simopoulos A.P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr.* 2002; 21 (6): 495–505. <https://doi.org/10.1080/07315724.2002.10719248>.
5. González-Pérez A., Planagumà A., Gronert K., et al. Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J.* 2006; 20 (14): 2537–9. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6250fje>.

6. Khalfoun B., Thibault F., Watier H., et al. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 400B: 589–97.
7. Wada M., DeLong C.J., Hong Y.H., et al. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem.* 2007; 282 (31): 22254–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703169200>.
8. Serhan C.N., Chiang N., Van Dyke T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8 (5): 349–61. <https://doi.org/10.1038/nri2294>.
9. Mori T.A. Omega-3 fatty acids and blood pressure. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2010; 56 (1): 83–92.
10. Serhan C.N., Libreros S., Nshimiyimana R. E-series resolvins: metabolome, biosynthesis and critical role of stereochemistry of specialized pro-resolving mediators (SPMs) in inflammation-resolution: preparing SPMs for long COVID-19, human clinical trials, and targeted precision nutrition. *Semin Immunol.* 2022: 101597. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2022.101597>.
11. Torshin I.Yu. Bioinformatics in the post-genomic era: the role of biophysics. NY: Nova Science Publishers; 2013: 255 pp.

Сведения об авторах

Торшин Иван Юрьевич – к.ф.-м.н., к.х.н., старший научный сотрудник Института фармакоинформатики ФИЦ «Информатика и управление» РАН. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>; WoS ResearcherID: C-7683-2018; Scopus Author ID: 7003300274; РИНЦ SPIN-код: 1375-1114.

Громова Ольга Алексеевна – д.м.н., профессор, научный руководитель Института фармакоинформатики ФИЦ «Информатика и управление» РАН. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>; WoS ResearcherID: J-4946-2017; Scopus Author ID: 7003589812; РИНЦ SPIN-код: 6317-9833. E-mail: unesco.gromova@gmail.com.

About the authors

Ivan Yu. Torshin – PhD (Phys. Math.), PhD (Chem.), Senior Researcher, Institute of Pharmacoinformatics, Federal Research Center “Informatics and Management”, RAS (Moscow, Russia). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>; WoS ResearcherID: C-7683-2018; Scopus Author ID: 7003300274; RSCI SPIN-code: 1375-1114.

Olga A. Gromova – Dr. Med. Sc., Professor, Research Supervisor, Institute of Pharmacoinformatics, Federal Research Center “Informatics and Management”, RAS (Moscow, Russia). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>; WoS ResearcherID: J-4946-2017; Scopus Author ID: 7003589812; RSCI SPIN-code: 6317-9833. E-mail: unesco.gromova@gmail.com.