

Изучение механизма конкурирующего ингибирующего действия метионина к токсическому воздействию сероводорода *in vivo* на основе моделирования молекулярных систем

DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2022.03.0002

© Л.И. Головацкая¹, М.Н. Тризно², Е.В. Голубкина², Н.Н. Тризно², О.С. Дюкарева²

¹ ФГБОУ ВО «Каспийский институт морского и речного транспорта им. генерал-адмирала Ф.М. Апраксина» – филиал ФГБОУ ВО «Волжский государственный университет водного транспорта» Федерального агентства морского и речного транспорта; г. Астрахань

² ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Астрахань

Для цитирования: Головацкая Леся Ивановна – ORCID 0000-0002-7181-2845, Тризно Матвей Николаевич – ORCID 0000-0001-8704-6594, Голубкина Екатерина Валерьевна – ORCID 0000-0001-6328-3317, Тризно Николай Николаевич, Дюкарева Оксана Сергеевна – ORCID 0000-0003-1829-2294. Изучение механизма конкурирующего ингибирующего действия метионина к токсическому воздействию сероводорода *in vivo* на основе моделирования молекулярных систем. Атеросклероз и дислипидемии. 2022;3(48):14–20. DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2022.03.0002

Абстракт

Цель. Оценка способности метионина к конкурентному ингибированию межмолекулярных взаимодействий липидных компонент мембран клеток по отношению к сероводороду.

Материалы и методы. Проведено математическое моделирование межмолекулярных взаимодействий метионина и сероводорода с компонентами клеточной мембраны. Осуществлены расчеты, основанные на теоретико-множественном анализе и квантово-химическом аппарате с использованием разработанных программ. Экспериментальная часть работы проведена *in vivo* с помощью лабораторных крыс при токсическом отравлении сероводородом.

Результаты. Представлены схемы, иллюстрирующие блокированные метионином реактивные центры триглицерида, фосфолипида и цитохрома P450 в условиях токсического воздействия сероводорода. Показатели выживаемости лабораторных животных подтвердили теоретически обоснованную возможность применения метионина в качестве ингибитора сероводорода.

Ключевые слова: математическое моделирование, сероводород, фосфолипид, метионин, триглицерид, цитохром P450.

Studying the mechanism of the competitive inhibiting effect of methionine to the toxic effect of hydrogen sulfide *in vivo* and based on mathematical modeling

L.I. Golovatskaya¹, M.N. Trizno², E.V. Golubkina², N.N. Trizno², O.S. Dyukareva²

¹ Caspian Institute of Sea and River Transport, Astrakhan, Russia

² Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

Abstract

Objective. Evaluation of the ability of methionine to competitive inhibition of intermolecular interactions of lipid components of cell membranes to hydrogen sulfide.

Materials and methods. Mathematical modeling of intermolecular interactions of methionine and hydrogen sulfide with the components of the cell membrane has been carried out. Calculations based on the set-theoretic analysis and quantum-chemical simulation carried out using the developed programs. The experimental part of the work carried out in vivo using murine models with toxic poisoning with hydrogen sulfide.

Results. Schemes illustrating the reactive centers of triglyceride, phospholipid and cytochrome P450 blocked by methionine under conditions of toxic exposure to hydrogen sulfide are presented. Survival rates of laboratory animals confirmed the theoretically substantiated possibility of using methionine as an inhibitor of hydrogen sulfide.

Keywords: mathematical modeling, hydrogen sulfide, phospholipid, methionine, triglyceride, cytochrome P450.

Введение

Теоретические разработки в области токсического воздействия на мембрану клетки основываются на описании химических реакций между веществами, изучении известных токсических воздействий на организм на уровне органов или отражении клинических картин токсических поражений [1-3]. Наличие значительного количества экспериментальных исследований, связанных с сероводородом (H_2S) — токсикантом, с одной стороны, и газотрансммитером — с другой, говорит о его неоднозначном значении во взаимодействии с мембранами клеток и особенно — липидных компонент [4]. Метаболизм липидов — один из фундаментальных метаболических процессов. Наиболее активно он происходит в печени и жировой ткани. Двумя основными компонентами клеточного липидного метаболизма являются фосфолипиды и триглицериды.

Разнообразны сведения и в отношении коррекции H_2S -дисбаланса. Например, учитывая метаболическую взаимосвязь с метионином, не всегда последствием увеличения его экзогенного поступления является гипергомоцистеинемия. Точно так же, как и рост продукции гомоцистеина не обязательно способствует формированию атеросклеротических изменений. Определяющее значение имеет и достаточное содержание витаминов (B6, B12, фолиевая кислота), генетические факторы и достаточный уровень холина, влияющий на синтез фосфотидилхолина из триглицеридов [5, 6]. Уровень последствий от экзогенного воздействия H_2S на организм чрезвычайно зависит от состояния биомембран, особенно фосфолипидного матрикса для белков — участников митохондриальной системы. Квантовое описание материи в применении к свойствам электронной плотности позволило получить строгую теорию, опираясь на которую, стало возможным применение *in silico* экспериментов.

С помощью авторской методики смоделирован механизм воздействия сероводорода на липидные

компоненты клеточной мембраны (ККМ) (фосфолипиды и триглицериды) и белковой (цитохром P450) [2].

Фосфолипиды — класс высших жиров, являющийся основой билипидного слоя клеточных мембран и органелл. Они состоят из 2 гидрофобных хвостов и гидрофильной головки с фосфатной группой, из-за чего относятся к группе амфифильных веществ и получили название фосфолипидов. Хвостовые участки соединены с остальной молекулой, как правило, с помощью глицерина. Фосфатная группа с лёгкостью может быть модифицирована действием холина, этаноламина и серина.

Триглицериды, важнейшие компоненты клеточной мембраны наряду с фосфолипидами, представляют собой многоцепочечную структуру и необходимы для барьерной функции и изоляции клетки с органеллами. В свободном состоянии встречаются в клетках печени и в адипоцитах, переносятся с током крови в комплексе с липопротеидами низкой и очень низкой плотности. Активно участвуют в энергетическом обмене. В ходе изучения процесса воздействия сероводорода удалось выделить основные центры взаимодействия ККМ и схематично их изобразить.

Цитохром P450 — крупное семейство ферментов с выраженной окислительной активностью, обнаруженное практически у всех живых организмов, за исключением облигатных анаэробов. Известно, что данные металлсодержащие ферменты играют роль во всех ключевых метаболических реакциях клетки. Известно, что сероводород блокирует ряд изоформ цитохрома P450 (CYP2B6, CYP2D6, CYP1A2 и CYP2C9) [7].

Сероводород — растворимый в воде газ (при физиологическом pH концентрация находится в пределах 2-3%). В норме он образуется эндогенно в клетках в субмикромольных концентрациях благодаря цистатионин-бета-синтетазе (CBS), цистатионин-гамма-лиаза (CSE), 3-меркаптопируватсульфаттрансферазе (3-MST) и цистеинаминотрансферазе (CAT). Ввиду крайне низкой естественной концентрации сероводород оказывает

исключительно локальное воздействие, распространяющееся на несколько клеток вокруг [3, 5].

Экзогенный сероводород может поступать различными путями, наиболее вероятно – через слизистую оболочку дыхательных путей или пищеварительного тракта. Известно об активном высвобождении H_2S из цистеина микробиотой толстой кишки, что играет важную роль в поддержании нормальной функции слизистой и объясняет высокую резистентность колоноцитов к токсическому воздействию H_2S . В высоких концентрациях вызывает поражение всех тканей и обладает выраженной цитотоксичностью, прежде всего действует на легкие (при респираторном пути проникновения) и вызывает нейродегенеративные поражения вне зависимости от пути проникновения. В крови легко диссоциирует при физиологическом уровне pH на H^+ , S^{2-} , HS^- анион. Легко диффундирует через билипидный слой клеточных мембран. Спектр химической активности внутри клетки включает прежде всего металлсодержащие белки (p450, цитохром C-оксидаза) [8, 9].

HS^- анион – сильный восстановитель, активно участвует в поглощении окислительных радикалов. Данный набор свойств позволяет ему быть одним из основных газотрансмиттеров – молекул газа, активно участвующих в метаболизме и поддержании клеточного гомеостаза.

Как упоминалось выше, физиологические значения концентрации сероводорода крайне малы, и, возможно, даже не обладают выраженным прямым антиоксидантным потенциалом в этом отношении. Наряду с этим, сероводород действует опосредованно, участвуя в реакциях с ферментами, обладающими антиоксидантной активностью, увеличивает уровень глутатиона – известного способа поддержания редокс – баланса.

По имеющимся данным, H_2S действует как на цепочку метаболизма липидов, так и напрямую. На основе этого математическое моделирование представляется предпочтительным способом выявления метаболических связей [10]. В результате предварительного отбора из гомологичных веществ нами был выбран метионин как ингибитор, который мы предполагаем использовать для подавления возможных негативных воздействий высоких концентраций сероводорода в воздухе.

Материалы и методы

Данные о структуре метионина были занесены в БД СКМ [11]. Воздействие метионина на ККМ моделировалось с учётом выбранных молекулярных комплексов – реакционных центров [12, 13] Под реакционными центрами мы подразумеваем атомы, способные образовывать водородную связь между контактирующими молекулами.

Характеристики образования водородной связи конкретного взаимодействия представляют собой следующие правила:

1. Расстояние R (измеряется в ангстремах $\text{\AA}$) между атомами в молекулах, между которыми образуется водородная связь, не превышает допустимой величины водородной связи для данных атомов.

2. Значение энергии адсорбции $\Delta E_{\text{адс}}$ (измеряется в кДж/моль) строго меньше нуля. Оно находится как разность между полными энергиями конечной $E_{\text{общ}}$ и суммой начальных структур (E_1 и E_2):

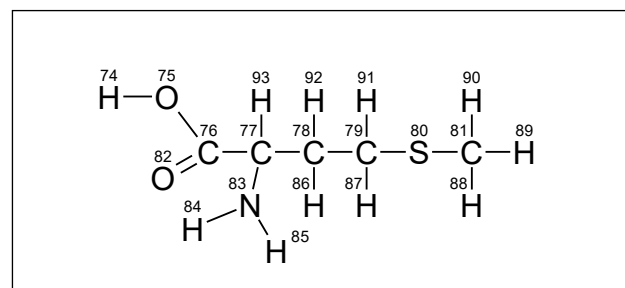
$$\Delta E_{\text{адс}} = E_{\text{общ}} - (E_1 + E_2)$$

3. Разность зарядов атомов Δq (измеряется в $\bar{e}$ – элементарных электрических зарядах $1,6021766208 \cdot 10^{-19} \text{ Кл}$) отлична от нуля. Если хотя бы одно из условий 1-3 не выполняется, то активный центр не образуется.

Численный эксперимент основан на поиске подобных атомарных последовательностей и построении моделей взаимодействия метионина с компонентами клеточных мембран, ведущих к соединениям достаточной прочности.

Исходные данные: структурные формулы молекул метионина (рис.1), фосфолипида ($CH_2-O-CO-R_1$), триглицерида ($C_3H_5(COO)_3-R$), цитохрома P450 и сероводорода ($H-S-H$).

Рисунок 1. Структурная формула молекулы метионина



2) Состав и структуру выбранных компонентов описывали кодом программы Gamess и представляли в виде z-матриц. В этой программе используется метод самосогласованного поля, который выгоден для расчета малых и средних молекулярных систем. С помощью квантово-химического расчёта верифицировали молекулярные построения и сохраняли в базе данных «z-матрицы». [13].

3) Далее мы систематизировали полученные данные об основных энергетических и геометрических свойствах образующихся комплексов молекул (табл. 1–3). В то же время с помощью алгоритмов, создающих z-матрицы участков межмолекулярных взаимодействий, проводилась оптимизация, т. е. анализировалась устойчивость межатомарных связей в квантово-химической программе. На основе полученной информации была составлена база данных «Сигнатуры активных центров» с последующей визуализацией в виде схем.

4) На последнем этапе эксперимента мы сравнивали полученные сигнатуры внутримолекулярных воздействий сероводорода и метионина с активными центрами мембранных компонентов. Схема работы программного комплекса для целенаправленного поиска конкурентных ингибиторов к заданному токсиканту была представлена нами ранее [14].

Для подтверждения полученных результатов совместно с сотрудниками ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России проводилась серия опытов на самцах половозрелых крыс с массой тела $224,0 \pm 7,4$ г. Проводимые манипуляции с животными соответствовали «Положению о содержании и использовании лабораторных животных в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации».

Подопытные крысы были разделены на 3 группы. В 1-й опытной группе (15 крыс) с первого до последнего дня (30 дней) эксперимента животным перорально вводили метионин из расчета 15 мг на 1 кг веса животного. Вторая опытная группа (15 крыс) была полностью аналогична 1-й, но получала метионин из расчета 25 мг на 1 кг массы тела. В 3-й группе (контрольная группа, 15 крыс) животным с первого до 30 дня эксперимента вводили воду, на которой готовился раствор метионина для 1 и 2 группы.

Токсическое воздействие обеспечивалось ингаляцией газовой смеси в затравочной камере. Газовая смесь представляла собой осушенный пластовый газ Астраханского газоконденсатного месторождения, содержащий 24 объемных % сероводорода. Затравка обеспечивалась по концентрации H_2S в 600 мг/м^3 и контролировалась с помощью индикаторных трубочек Вауег. Длительность воздействия была в прямой зависимости от гибели всей группы, т.е. затравка закачивалась по достижении LT100.

Результаты и обсуждение

Полученные базисные данные об энергетических и геометрических свойствах образующихся комплексов молекул взаимодействия метионина с фосфолипидом, триглицеридом и цитохромом P450 мы представили в таблицах 1, 2 и 3 соответственно.

В результате моделирования и исследования структур межмолекулярных взаимодействий выявились наиболее вероятные центры взаимодействия метионина (см. рис. 1).

Схема блокированных метионином реакционных центров при токсическом воздействии на фосфолипид показана на рисунке 2, на триглицерид – на рисунке 3.

Схема блокированных метионином реактивных центров при токсическом воздействии на цитохром P450 показана на рисунке 4.

Таблица 1. Основные зарядовые, энергетические и геометрические характеристики в адсорбционных комплексах взаимодействия метионина с фосфолипидом

АК	По связи	R, Å	Δq , e	$\Delta E_{адс}$, кДж/моль	АК	По связи	R, Å	Δq , e	$\Delta E_{адс}$, кДж/моль
1	O11–H74	1,78	-0,303	-44,24	9	O11–H74	1,86	-0,118	-16,48
2	O17–H74	1,80	-0,294	-36,56	10	H22–O82	2,69	0,001	-16,04
3	O19–H74	1,79	-0,301	-30,56	11	H21–O82	1,85	0,013	-14,84
4	O13–H74	1,79	-0,296	-28,57	12	H22–O82	1,87	0,011	-12,01
5	O17–H74	2,42	-0,001	-23,53	13	O13–H74	1,86	-0,109	-11,34
6	H32–O82	2,67	0,001	-21,34	14	O19–H74	1,84	-0,120	-8,19
7	H31–O82	2,62	-0,012	-20,89	15	O17–H74	1,85	-0,102	-7,09
8	O13–H85	2,61	-0,002	-18,83					

Таблица 2. Основные зарядовые, энергетические и геометрические характеристики в адсорбционных комплексах взаимодействия метионина с триглицеридом

АК	По связи	R, Å	Δq , e	$\Delta E_{адс}$, кДж/моль
1	O11–H84	1,78	-0,295	-43,66
2	O14–H84	1,79	-0,298	-38,91
3	O13–H84	1,80	-0,288	-26,66

Таблица 3. Основные зарядовые, энергетические и геометрические характеристики в адсорбционных комплексах взаимодействия метионина с цитохромом P450

АК	По связи	R, Å	Δq , e	$\Delta E_{адс}$, кДж/моль	АК	По связи	R, Å	Δq , e	$\Delta E_{адс}$, кДж/моль
1	O5–H85	1,86	-0,141	-40,22	4	H11–O82	1,89	0,021	-15,48
2	O7–H74	1,82	-0,125	-32,51	5	H12–O82	1,85	0,072	-10,55
3	O8–H74	1,86	-0,201	-30,33	6	Fe6–H74	4,78	-0,053	-3,65

Рисунок 2. Схема блокированных метионином реакционных центров при токсическом воздействии на фосфолипид

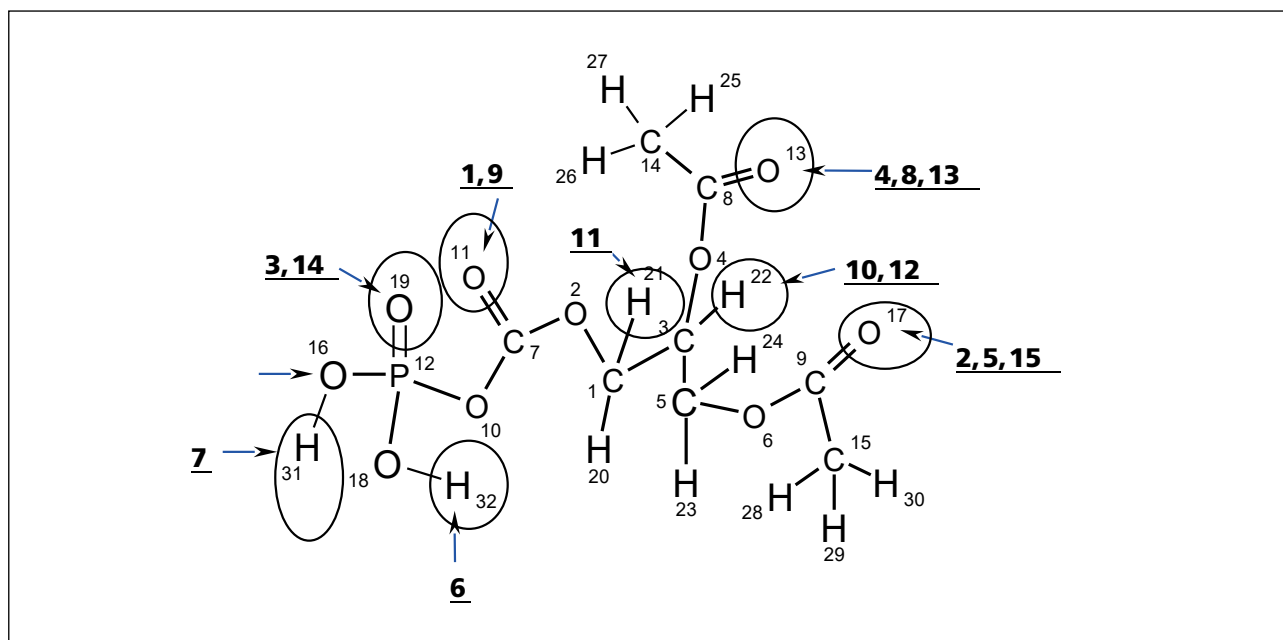


Рисунок 3. Схема блокированных метионином активных центров при токсическом воздействии на триглицерид

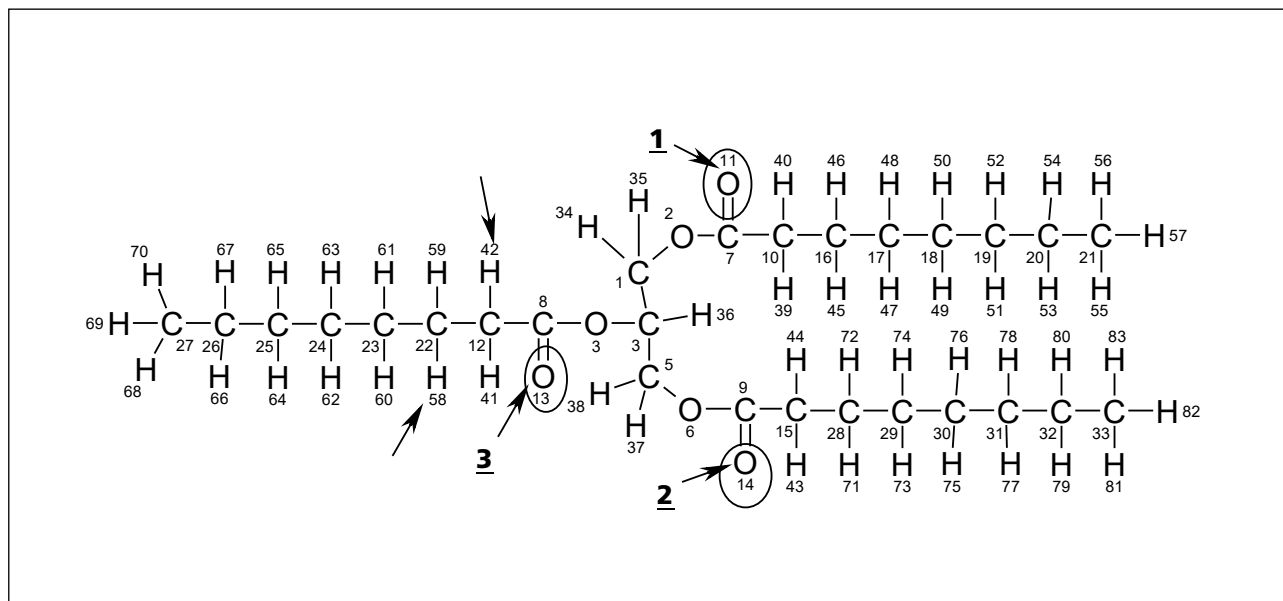
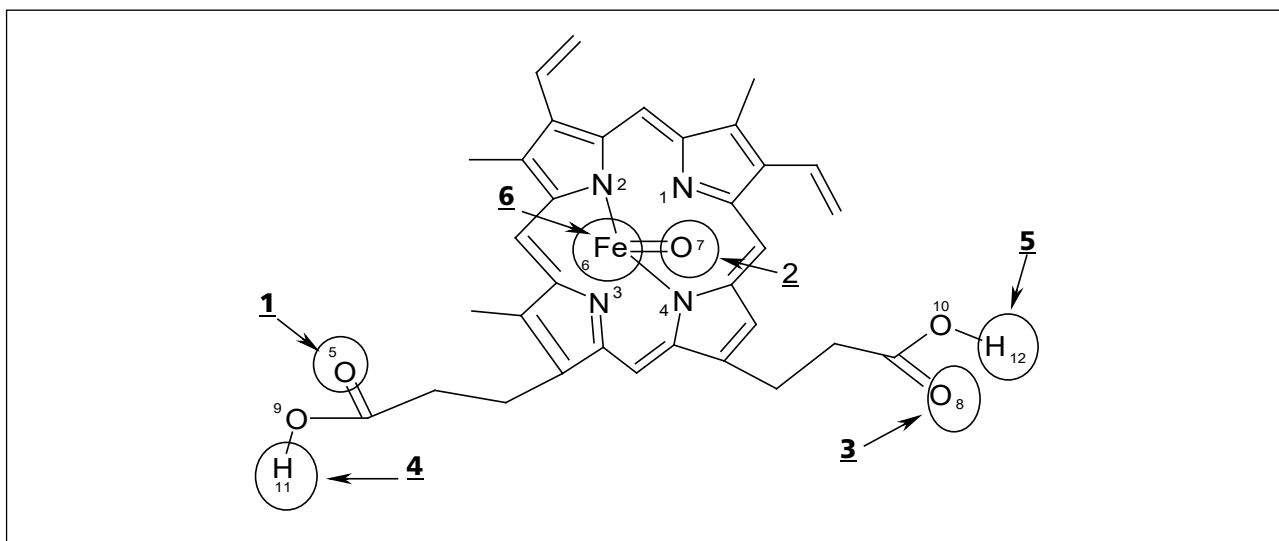


Рисунок 4. Схема блокированных метионином реактивных центров при токсическом воздействии на цитохром P450



На представленных схемах стрелками отмечены реакционные центры ККМ при воздействии на нее сероводородом, а кружочками выделены центры, заблокированные от воздействия сероводорода метионином.

Таким образом, общая картина воздействия метионина на ККМ подобна воздействию сероводорода. Центры взаимодействия ККМ при этих воздействиях незначительно отличаются друг от друга. Следовательно, степень эффективности метионина как конкурентного ингибитора теоретически доказана и требует подтверждения в лабораторных экспериментах.

В результате проведенного эксперимента была выявлена зависимость времени смерти лабораторных животных от условий вхождения в стадию затравки сероводородом. В контрольной группе LT50 – 17 мин, LT100 – 35 мин; опытные группы продемонстрировали лучший показатель

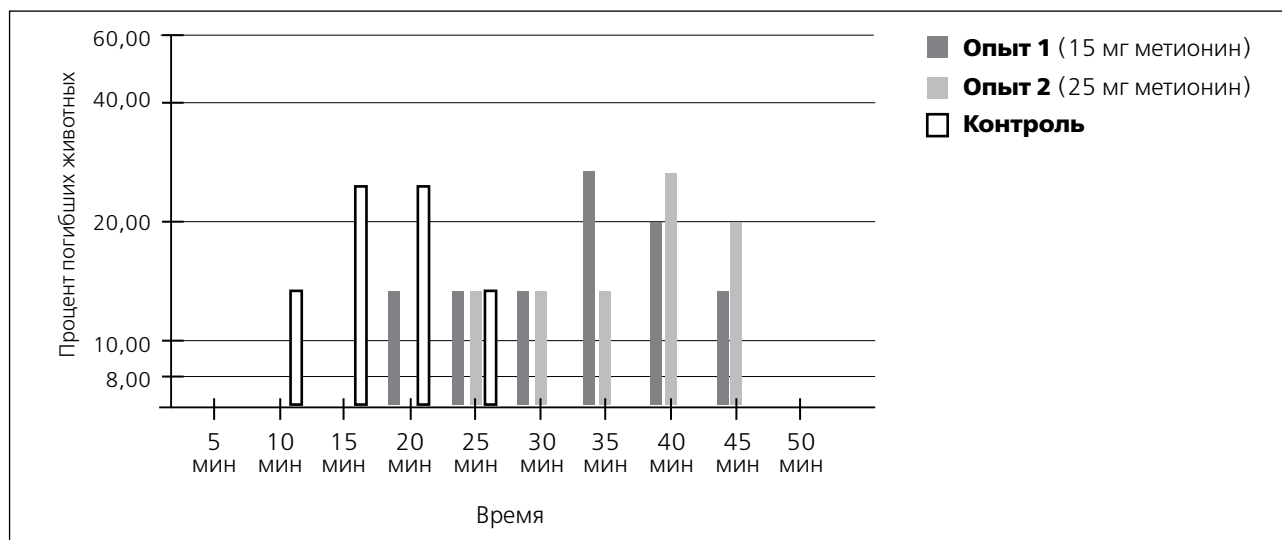
выживаемости: в группе 1 (15 мг/1 кг) LT50 – 32 мин, LT100 – 45 мин, в группе 2 (25 мг/1 кг) LT50 – 35 мин, LT100 – 50 мин (рис. 5).

Заключение

Примененный подход к симуляции химических реакций можно признать перспективным и практикоориентированным. Проведенное математическое моделирование вероятных реакций метионина и сероводорода с компонентами клеточной стенки и внутриклеточных ферментов надежно выявило центры взаимодействия и конкурентного ингибирования.

Данные, полученные в ходе лабораторного эксперимента, подтвердили вывод об эффективности метионина как конкурентного ингибитора к сероводороду. Помимо этого в эксперименте не была выявлена значительная дозозависимость

Рисунок 5. Диаграмма LT лабораторных животных в эксперименте



приема метионина, обе опытные группы имели схожие результаты резистентности к сероводороду (см. рис. 5).

Таким образом, решая задачи по поиску ингибиторов, возможно продвинуться в изучении потенциальных антидотов для ряда веществ, обладающих цитотоксическими свойствами.

Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

Conflict of interests

There is no conflict of interest.

Благодарность

Авторы выражают глубочайшую благодарность ныне ушедшему из жизни доктору химических наук, профессору, академику РАН Нариману Мирзаевичу Алыкову.

Gratitude

The authors express their deepest gratitude to the now deceased Doctor of American Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences Nariman Mirzaevich Alykov.

Список литературы / References

1. Trizno NN, Golubkina EV, Trizno MN, Dyukareva OS. The condition hemostasis system in rats after chronic intoxication of hydrogensulfide gas. *Modern Problems of Science and Education*. 2017;4:75-83. In Russian (Тризно Н.Н., Голубкина Е.В., Тризно М.Н., Дюкарева О.С. Состояние системы гемостаза у крыс после хронической интоксикации сероводородсодержащим газом. *Современные проблемы науки и образования*. 2017;4:75-83).
2. Zharkib LI, Golubkina EV, Trizno NN. A method for preventing intoxication of the animal body in acute poisoning with hydrogen sulfide gas in an experiment. Patent for an invention 2739256 C1, 22.12.2020. Application No. 2019136190 dated 12.11.2019. In Russian (Жарких Л.И., Голубкина Е.В., Тризно Н.Н. Способ профилактики интоксикации организма животных при остром отравлении сероводородсодержащим газом в эксперименте. Патент на изобретение 2739256 C1, 22.12.2020. Заявка № 2019136190 от 12.11.2019).
3. Dillon KM, Matson JB. A Review of Chemical Tools for Studying Small Molecule Persulfides: Detection and Delivery. *ACS Chem Biol*. 2021;16(7):1128-1141. doi: 10.1021/acscchembio.1c00255.
4. Cuevasanta E, Denicola A, Alvarez B, Müller MN. Solubility and permeation of hydrogen sulfide in lipid membranes. *PLoS One*. 2012;7(4):e34562. doi: 10.1371/journal.pone.0034562.
5. Blachier F, Andriamibaja M, Blais A. Sulfur-Containing Amino Acids and Lipid Metabolism. *J Nutr*. 2020;150(Suppl 1):2524S-2531S. doi: 10.1093/jn/nxaa243.
6. Ng PC, Hendry-Hofer TB, Witeof AE, Brenner M, Mahon SB, Boss GR, et al. Hydrogen Sulfide Toxicity: Mechanism of Action, Clinical Presentation, and Countermeasure Development. *J Med Toxicol*. 2019;15(4):287-294. doi: 10.1007/s13181-019-00710-5.
7. Wang X, Chen M, Chen X, Ma J, Wen C, Pan J, et al. The effects of acute hydrogen sulfide poisoning on cytochrome P450 isoforms activity in rats. *Biomed Res Int*. 2014;2014:209393. doi: 10.1155/2014/209393.
8. Gennari M, Duboc C. Bio-inspired, Multifunctional Metal-Thiolate Motif: From Electron Transfer to Sulfur Reactivity and Small-Molecule Activation. *Acc Chem Res*. 2020;53(11):2753-2761. doi: 10.1021/acs.accounts.0c00555
9. Sosa-Torres ME, Kroneck PM. Introduction: Transition Metals and Sulfur. In *Transition Metals and Sulfur - A Strong Relationship for Life*. Eds. ME Sosa-Torres, PM Kroneck. Berlin, Boston: De Gruyter, 2020:1-18. <https://doi.org/10.1515/9783110589757-007>.
10. Loiselle JJ, Yang G, Wu L. Hydrogen sulfide and hepatic lipid metabolism - a critical pairing for liver health. *Br J Pharmacol*. 2020;177(4):757-768. doi: 10.1111/bpb.14556.
11. Zharkib LI. Structure of software for modeling intermolecular interaction of cell membrane with toxicants in the search for antidotes. *Caspian Journal Management and High Technologies*. 2019;47(3):82-94. In Russian (Жарких Л.И. Структура программного обеспечения процесса моделирования межмолекулярного взаимодействия клеточной мембраны с токсикантами. *Прикаспийский журнал: управление и высокие технологии*. Научно-технический журнал. 2019;47(3):82-94).
12. Zharkikb LI, Serezhko YuA, Alykov NM, Malev AA. Certificate of state registration of computer programs No. 2011611798. Automation of calculations of the main energy and charge characteristics in the modeling of intermolecular interactions. Registered in the register of computer programs on 28.02.2011. In Russian (Жарких Л.И., Очередко Ю.А., Алыков Н.М., Малев А.А. Свидетельство о гос. регистрации программ для ЭВМ №2011611798. Автоматизация расчетов основных энергетических и зарядовых характеристик при моделировании межмолекулярных взаимодействий. *Зарегистр. в реестре программ для ЭВМ* 28.02.2011).
13. Zharkikb LI, Degtyarev AS. Certificate of state registration of computer programs No. 2015616182. Generator of z-matrices of molecules. Registered in the register of computer programs 02.06.2015. In Russian (Жарких Л.И., Дегтярев А.С. Свидетельство о гос. регистрации программ для ЭВМ №2015616182. Генератор z-матриц молекул. *Зарегистр. в реестре программ для ЭВМ* 02.06.2015).
14. Zharkikb LI, Smirnova YA, Azhmukbamedov IM, Golubkina EV, Trizno MN. Inhibitors selection to influenza virus a by method of blocking intermolecular interaction. *Studies in Systems, Decision and Control*. 2021;333:227-237.