

С. Л. Тихонов

*Уральский государственный аграрный университет,
Уральский государственный лесотехнический университет
(г. Екатеринбург, Российская Федерация)*

П. С. Стягова

*Уральский государственный лесотехнический университет
(г. Екатеринбург, Российская Федерация)*

Н. В. Тихонова

*Уральский государственный аграрный университет
(г. Екатеринбург, Российская Федерация)*

Н. Н. Стягов

*Уральский государственный лесотехнический университет
(г. Екатеринбург, Российская Федерация)*

**ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ *IN SILICO*
ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТАБОЛИЗМА АНТИОКСИДАНТНОГО
ПИЩЕВОГО БИОПЕПТИДА**

Аннотация. В данной работе представлено исследование антиоксидантного пептида с аминокислотной последовательностью *STKSICTKKTLRTCPPIC*, разработанного с использованием метода молекулярно-пептидной трансплантации (МПТ). Проведён виртуальный скрининг *in silico* на платформе *ADMETlab 3*, который позволил оценить метаболическую устойчивость пептида в организме человека и его взаимодействие с ферментами цитохрома P450. Установлено отсутствие ингибирующих и субстратных свойств по отношению к основным ферментам группы P450 (*CYP1A2*, *CYP2C19*,

CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, CYP2C8), метаболизирующим лекарственные вещества. Не являясь ингибитором и субстратом для вышеперечисленных ферментов, пептид остается стабильным в организме человека при пероральном применении и не вступает в нежелательные межлекарственные взаимодействия. Это, в свою очередь, свидетельствует о биодоступности, быстрой усвояемости и низкой токсичности данного биологически активного соединения для человека.

Ключевые слова: пептид, антиоксидантный пептид, виртуальный скрининг, лекарственный метаболизм, биотехнология

VIRTUAL *IN SILICO* SCREENING OF METABOLIC PARAMETERS OF AN ANTIOXIDANT FOOD BIOPEPTIDE

Annotation. *This paper presents a study of an antioxidant peptide with the amino acid sequence CTKSICTKKTLRTCPPIC, developed using the molecular peptide transplantation (MPT) method. A virtual in silico screening was conducted on the ADMETlab 3 platform, which made it possible to assess the metabolic stability of the peptide in the human body and its interaction with cytochrome P450 enzymes. The absence of inhibitory and substrate properties with respect to the main enzymes of the P450 group (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, CYP2C8) metabolizing drugs has been established. Not being an inhibitor and substrate for the above enzymes, the peptide remains stable in the human body with oral administration and does not enter into undesirable drug interactions. This, in turn, indicates the bioavailability, rapid digestibility and low toxicity of this biologically active compound for humans.*

Keywords: *peptide, antioxidant peptide, virtual screening, drug metabolism, biotechnology*

Для цитирования

Тихонов, С. Л. Виртуальный скрининг *IN SILICO* показателей метаболизма антиоксидантного пищевого биопептида / С. Л. Тихонов, П. С. Стягова, Н. В. Тихонова, Н. Н. Стягов // Вестник биотехнологии. 2024. № 3.

Введение. Прогнозирование *in silico*, или виртуальный скрининг, является перспективным и эффективным методом исследования и предсказания свойств новых биологически активных веществ (БАВ) в биотехнологии пищевой и фармацевтической отраслей. В последние годы методы виртуального моделирования в биомедицине открывают все новые возможности для их применения при уточнении и частичной замене экспериментов как на животных, так и на людях, а также дают большое преимущество для быстрой оценки токсичности соединений [1]. В разработке лекарственных средств виртуальный скрининг широко используется для изучения метаболизма препаратов, выявления фармакокинетической изменчивости, риска взаимодействий и ингибирования других лекарств. Прогнозирование *in silico* позволяет корректировать систему клинических исследований лекарственных средств, минимизировать человеческий риск в клинических испытаниях, а также сэкономить финансовые и временные ресурсы за счет упрощения процесса разработки новых лекарственных соединений, таких, например, как биопептиды [2]. Традиционно процесс разработки новых пептидов следует стандартизированной процедуре, которая включает в себя выбор исходного белка, ферментативный гидролиз, изоляцию, очистку и идентификацию, а также анализ информации об активности, аминокислотной последовательности, структуре и соответствующих функциональных свойствах нового пептида. Однако этот подход является дорогостоящим и трудоемким, и, что более важно, он не соответствует требованиям промышленного масштабного производства. В последние годы создание новых систем анализа биоинформатики (*in silico*) открывают все большие возможности для изучения биопептидов [3].

Биопептиды являются значительной подгруппой фармацевтических препаратов, проявляющие уникальные свойства, основанные на последовательности определенных аминокислот. Пептидомика, как новая область биологических наук, применяет современные методы изоляции, анализа и вычислений для изучения пептидов в биологических образцах, что открывает перспективы для использования пептидов в качестве биомаркеров и терапевтических средств [4]. Развитие пептидомики требует использования мультидисциплинарных подходов для оптимизации периода полураспада, биологической активности и растворимости пептидов в организме человека [5].

Биопептиды вызывают значительный интерес благодаря их обширным физиологическим свойствам, таким, например, как антиоксидантное, противомикробное, иммуномодулирующее и антидиабетическое. Однако большинство пептидов разрушается в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), а некоторые могут обладать токсичностью и аллергенностью, что ограничивает их коммерческое применение. Именно поэтому виртуальный скрининг, позволяющий предсказать негативные для человека свойства новых пептидов, так актуален на сегодняшний день [6].

Желудочно-кишечный тракт человека содержит множество эндо- и экзопептидаз, ферментов, которые гидролизуют пептидные связи и разрушают белковые молекулы [7]. Решить проблему разрушения пептидных цепочек в человеческом ЖКТ можно с помощью молекулярно-пептидной трансплантации (МПТ). Этот инновационный подход позволяет перенести функции или структурные элементы от одной молекулы к другой и выбрать белковые каркасы для встраивания в них других белков с подходящими свойствами. Например, можно использовать пептиды, богатые дисульфидами, так как они отличаются стабильностью, обеспечивающей устойчивость пептидов к физическому, химическому и биологическому расщеплению при пероральном применении [8].

Среди различных компонентов, входящих в состав пищевых продуктов, антиоксиданты, являются одними из самых важных, т.к. они способны нейтрализовать активность свободных радикалов (продуцируемую активными формами кислорода (АФК)). Доказано, что свободнорадикальная активность в организме человека вызывает кумулятивный окислительный стресс, который стимулирует развитие болезни Альцгеймера. Большинство антиоксидантов имеют π -конъюгат или тиоловую группу в своих молекулярных структурах, поскольку π -конъюгат стабилизирует радикал путем его делокализации, а две тиоловые группы образуют дисульфидную связь в его антиоксидантном процессе [9].

В последнее время спрос на антиоксидантные соединения на рынке увеличился из-за роста дегенеративных заболеваний, связанных с избыточным образованием свободных радикалов и нежелательными побочными эффектами различных лекарств, для которых исследователи предложили диеты,

богатые биоактивными соединениями, такими, например, как пищевые биопептиды с антиоксидантными свойствами [10]. Биопептиды, используемые для борьбы с окислительным стрессом, помимо их потенциала в качестве лекарственных средств, могут применяться в качестве пищевых добавок, для повышения биологической ценности функциональных продуктов питания, а также как антивозрастные и фотозащитные компоненты в косметике. Многочисленные эксперименты показали, что добавление антиоксидантных белковых гидролизатов или пептидов может эффективно ингибировать перекисное окисление липидов во время транспортировки и хранения продуктов питания, тем самым сохраняя стабильность вкуса продуктов и их питательные качества [3].

Подводя итог, можно сказать, что промышленное производство биологически активных антиоксидантных веществ, в том числе пептидов, является перспективным направлением в современной биотехнологии.

Цель — виртуальный скрининг *in silico* показателей метаболизма пищевого антиоксидантного биопептида в организме человека.

Материалы и методы исследования. В качестве объектов исследования использовались аминокислотные последовательности пептидов с антиоксидантными свойствами (рис. 1).

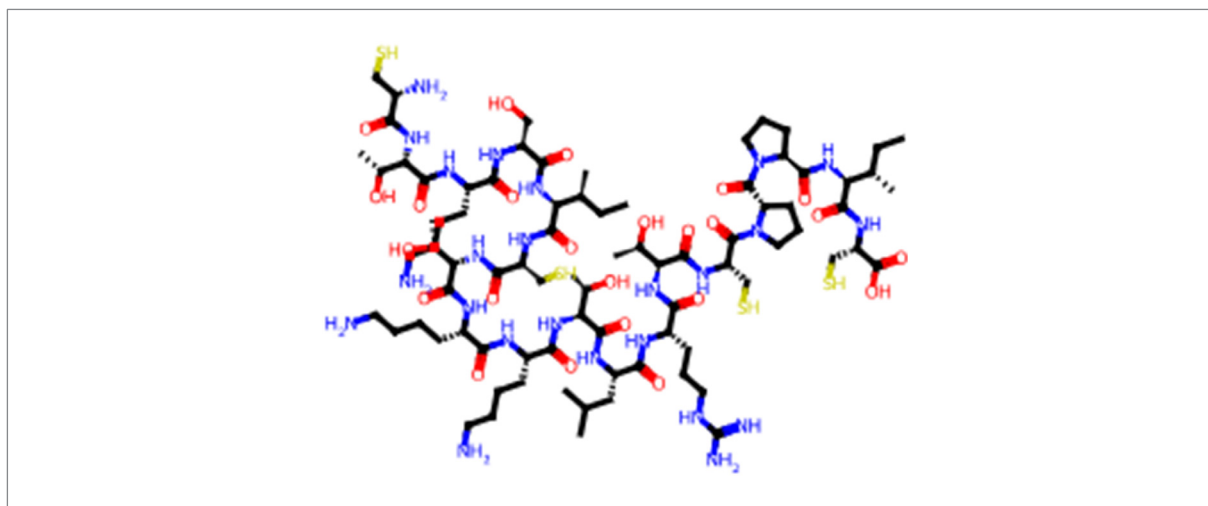


Рис. 1 Антиоксидантный пищевой биопептид, полученный с использованием молекулярной трансплантации

Проектирование пептидов осуществлялось на основе данных об их антиоксидантных свойствах, полученных из литературных источников. Для предсказания свойств метаболизма данного пептида в организме использовали платформу ADMETlab 3 (<https://admetlab3.scbdd.com/documentation/#/>).

Результаты и обсуждение. В результате прогнозирования на платформе ADMETlab 3 свойств метаболизма антиоксидантного пептида с аминокислотной последовательностью **СТКСICTKKTLRTCPPIС**, полученного с помощью МПТ, мы спроектировали значения, представленные в таблице 1. Основные параметры включают способность пептида выступать в роли ингибитора или субстрата для различных ферментов из группы цитохром P450.

Таблица 1 — *Виртуальный скрининг по метаболизму пептида в организме*

Показатель	Значение	Комментарий
CYP1A2 inhibitor	0.0	CYP1A2 inhibitor 0 означает, что вероятность того, что вещество является ингибитором CYP1A2, равна 0.0, или, другими словами, данное вещество не ингибирует CYP1A2 и относится к категории 0 (не ингибитор). Если бы вероятность приближалась к 1.0, это указывало бы на то, что вещество является ингибитором, относящимся к категории 1.
CYP1A2 substrate	0.0	Значение 0.0 говорит о том, что данное вещество не является субстратом CYP1A2 и относится к категории 0 (non-substrate). Если бы значение приближалось к 1.0, это указывало бы на то, что вещество метаболизируется этим ферментом (категория 1).
CYP2C19 inhibitor	0.0	CYP2C19 inhibitor 0 означает, что вероятность того, что вещество является ингибитором CYP2C19, равна 0.0, или, другими словами, данное вещество не ингибирует CYP2C19 и относится к категории 0 (не ингибитор). Если бы вероятность приближалась к 1.0, это указывало бы на то, что вещество является ингибитором, относящимся к категории 1.
CYP2C9 inhibitor	0.0	CYP2C9 inhibitor 0 означает, что вероятность того, что вещество является ингибитором CYP2C9, равна 0.0, или, другими словами, данное вещество не ингибирует CYP2C9 и относится к категории 0 (не ингибитор). Если бы вероятность приближалась к 1.0, это указывало бы на то, что вещество является ингибитором, относящимся к категории 1.
CYP2C9 substrate	0.0	Значение 0.0 говорит о том, что данное вещество не является субстратом CYP2C9 и относится к категории 0 (non-substrate). Если бы значение приближалось к 1.0, это указывало бы на то, что вещество метаболизируется этим ферментом (категория 1).

CYP2D6 inhibitor	0.0	Значение 0.0 говорит о том, что данное вещество не является субстратом CYP2D6 и относится к категории 0 (non-substrate). Если бы значение приближалось к 1.0, это указывало бы на то, что вещество метаболизируется этим ферментом (категория 1).
CYP2D6 substrate	0.0	CYP3A4 inhibitor 0.0 означает, что вероятность того, что вещество является ингибитором CYP3A4, равна 0.0, или, другими словами, данное вещество не ингибирует CYP3A4 и относится к категории 0 (не ингибитор). Если бы вероятность приближалась к 1.0, это указывало бы на то, что вещество является ингибитором, относящимся к категории 1.
CYP3A4 inhibitor	0.0	Значение 0.0 говорит о том, что данное вещество не является субстратом CYP3A4 и относится к категории 0 (non-substrate). Если бы значение приближалось к 1.0, это указывало бы на то, что вещество метаболизируется этим ферментом (категория 1).
CYP3A4 substrate	0.0	Значение 0.0 говорит о том, что данное вещество не является субстратом CYP3A4 и относится к категории 0 (non-substrate). Если бы значение приближалось к 1.0, это указывало бы на то, что вещество метаболизируется этим ферментом (категория 1).
CYP2B6 substrate	0.0	Значение 0.0 говорит о том, что данное вещество не является субстратом CYP2B6 и относится к категории 0 (non-substrate). Если бы значение приближалось к 1.0, это указывало бы на то, что вещество метаболизируется этим ферментом (категория 1).
CYP2C8 inhibitor	0.0	CYP2C8 inhibitor 0 означает, что вероятность того, что вещество является ингибитором CYP2C8, равна 0.0, или, другими словами, данное вещество не ингибирует CYP2C8 и относится к категории 0 (не ингибитор). Если бы вероятность приближалась к 1.0, это указывало бы на то, что вещество является ингибитором, относящимся к категории 1.
CYP3A4 inhibitor	0.0	CYP3A4 inhibitor 0.0 означает, что вероятность того, что вещество является ингибитором CYP3A4, равна 0.0, или, другими словами, данное вещество не ингибирует CYP3A4 и относится к категории 0 (не ингибитор). Если бы вероятность приближалась к 1.0, это указывало бы на то, что вещество является ингибитором, относящимся к категории 1.
CYP2C19 substrate	0.0	Значение 0.0 говорит о том, что данное вещество не является субстратом CYP2C19 и относится к категории 0 (non-substrate). Если бы значение приближалось к 1.0, это указывало бы на то, что вещество метаболизируется этим ферментом (категория 1).

Цитохромы P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, CYP2C8) — это семейство ферментов, участвующих в метаболизме лекарственных веществ. Метаболизм лекарств — это процесс химического изменения их молекул после их попадания в человеческий организм. Метаболическое расщепление лекарственных средств через специализированные ферментативные системы. Ингибирование ферментов цитохрома P450 может привести к снижению метаболизма других лекарств и увеличению их токсичности [11]. К веществам-ингибиторам цитохромов P450 относятся соединения из категории 1, которые могут взаимодействовать с другими препаратами, замедляя их метаболизм и увеличивая риски побочных эффектов. Используя виртуальный скрининг *in silico*, мы спрогнозировали ингибирующие свойства пептида. Исследуемый пептид по показателям ферментов-цитохром P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, CYP2C8) не является ингибитором, так как значение вышеперечисленных показателей находятся в пределах 0.0. В контексте метаболизма это говорит о том, что пептид не замедляет активность этих ферментов, не мешает их нормальной работе и не увеличивает концентрацию лекарств, которые метаболизируются этими ферментами, в организме. Это снижает риск токсичности и нежелательных лекарственных взаимодействий, а также указывает на отсутствие отрицательного воздействия при взаимодействии с другими лекарственными препаратами из этой группы.

Вещества, являющиеся субстратами ферментов цитохрома P450, метаболизируются этими ферментами. Субстрат — это важный параметр для прогнозирования скорости метаболизма вещества и оценки его стабильности и устойчивости к метаболизму в организме человека [12]. Если пептид является субстратом, то он относится к категории 1, метаболизируется через соответствующий фермент и быстро разрушается в организме человека. Это, в свою очередь, влияет на терапевтическую эффективность и период полувыведения пептида, который влияет на биодоступность соединения. Следовательно, если значение показателей субстрата находится в пределах меньше 1, то исследуемое вещество не проявляет себя как соответствующий ферменту субстрат, и эффективно усваивается организмом человека. Вещество, которое не является субстратом фермента, не будет активно расщепляться этим ферментом, а значит, оно может обладать

большей устойчивостью и стабильностью в организме. Основываясь на полученных нами данных, можно сказать, что пептид с аминокислотной последовательностью **СТКСІСТККTLRTCPPIC** и спроектированными антиоксидантными свойствами, не является субстратом для ферментов-цитохром группы P450, так как все значения показателей находятся в пределах 0.0.

Таким образом, исследуемый нами пептид обладает потенциальной безопасностью для применения в качестве лекарственного соединения, не вызывая нежелательных лекарственных взаимодействий и обладая стабильностью в метаболической системе человека.

Заключение. Проведенное исследование продемонстрировало эффективность использования виртуального скрининга *insilico* для оценки свойств метаболизма антиоксидантного биопептида, полученного с помощью молекулярной пептидной трансплантации (МПТ). Выявлено, что изучаемый пептид с аминокислотной последовательностью **СТКСІСТККTLRTCPPIC** не является субстратом и не ингибирует ферменты группы цитохромов P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, CYP2C8), что значительно снижает риск токсичности и нежелательных взаимодействий исследуемого пептида с другими лекарственными средствами. Данное исследование подтверждает перспективы использования виртуального скрининга для разработки новых безопасных биопептидных соединений с высокой биологической активностью и заданными терапевтическими свойствами для применения в фармацевтической и пищевой биотехнологии.

Список литературы

1. *Pappalardo F., Russo G., Tshinanu F. M., Viceconti M. In silico clinical trials: concepts and early adoptions. Brief Bioinform. 2019 Sep 27;20(5):1699-1708. doi: 10.1093/bib/bby043. PMID: 29868882*
2. *Tan B. H., Pan Y., Dong A. N., Ong C. E. In vitro and in silico Approaches to Study Cytochrome P450-Mediated Interactions. J Pharm Pharm Sci. 2017;20(1):319-328. doi: 10.18433/J3434R. PMID: 29145931*

3. *Zhu Y., Lao F., Pan X., Wu J.* Food Protein-Derived Antioxidant Peptides: Molecular Mechanism, Stability and Bioavailability. *Biomolecules*. 2022 Nov 3;12(11):1622. doi: 10.3390/biom12111622. PMID: 36358972; PMCID: PMC9687809.
4. *Perpetuo L., Klein J., Ferreira R., Guedes S., Amado F., Leite-Moreira A., Silva A. M. S., Thongboonkerd V., Vitorino R.* How can artificial intelligence be used for peptidomics? *Expert Rev Proteomics*. 2021 Jul;18(7):527-556. doi: 10.1080/14789450.2021.1962303. PMID: 34343059
5. *Aslan A., Ari Yuka S.* Therapeutic peptides for coronary artery diseases: in silico methods and current perspectives. *Amino Acids*. 2024 May 31;56(1):37. doi: 10.1007/s00726-024-03397-3. PMID: 38822212; PMCID: PMC11143054.
6. *Singh P. P., Gupta V., Prakash B.* Recent advancement in functional properties and toxicity assessment of plant-derived bioactive peptides using bioinformatic approaches. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2023;63(20):4503-4521. doi: 10.1080/10408398.2021.2002807. PMID: 34783283
7. *Woodley J. F.* Enzymatic barriers for GI peptide and protein delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1994;11(2-3):61-95. PMID: 7600588.
8. *Wang C. K., Craik D. J.* Linking molecular evolution to molecular grafting. *J Biol Chem*. 2021 Jan-Jun;296:100425. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100425. PMID: 33600801
9. *Ozawa H., Miyazawa T., Burdeos G. C., Miyazawa T.* Biological Functions of Antioxidant Dipeptides. *J NutrSci Vitaminol (Tokyo)*. 2022;68(3):162-171. doi: 10.3177/jnsv.68.162. PMID: 35768247
10. *López-García G., Dublan-García O., Arizmendi-Cotero D., Gómez Oliván L. M.* Antioxidant and Antimicrobial Peptides Derived from Food Proteins. *Molecules*. 2022 Feb 16;27(4):1343. doi: 10.3390/molecules27041343. PMID: 35209132; PMCID: PMC8878547.
11. *Zhao M., Ma J., Li M., Zhang Y., Jiang B., Zhao X., Huai C., Shen L., Zhang N., He L., Qin S.* Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 26;22(23):12808. doi: 10.3390/ijms222312808. PMID: 34884615; PMCID: PMC8657965.
12. *Elfaki I., Mir R., Almutairi F. M., Duhier F. M. A.* Cytochrome P450: Polymorphisms and Roles in Cancer, Diabetes and Atherosclerosis. *Asian Pac J*

Cancer Prev. 2018 Aug 24; 19(8):2057-2070. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.8.2057. PMID: 30139042; PMCID: PMC617137.

Тихонов Сергей Леонидович — доктор технических наук, профессор кафедры, Уральский государственный аграрный университет, Уральский государственный лесотехнический университет. 620075, Российская Федерация, г. Екатеринбург, ул. Карла Либкнехта, 42. E-mail: tihonov75@bk.ru ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

Стягова Полина Сергеевна — магистрант, Уральский государственный лесотехнический университет. 620100, Российская Федерация, г. Екатеринбург, Сибирский тракт, 37. E-mail: polinakrutikova1610@gmail.com.

Тихонова Наталья Валерьевна — доктор технических наук, профессор, зав. кафедрой пищевой инженерии аграрного производства, Уральский государственный аграрный университет, г. Екатеринбург. E-mail: kaf.zooing@urgau.ru.

Стягов Николай Николаевич — магистрант, Уральский государственный лесотехнический университет. 620100, Российская Федерация, г. Екатеринбург, Сибирский тракт, 37. E-mail: nstyagov@gmail.com.

Tikhonov Sergey Leonidovich — Doctor of Technical Sciences, Professor of the Department, Ural State Agrarian University, Ural State Forestry University. 42 Karl Liebknecht str., Yekaterinburg, 620075, Russian Federation. Email: tihonov75@bk.ru ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

Styagova Polina Sergeevna — undergraduate student, Ural State Forestry University. 37Sibirskiytrakt, Yekaterinburg, 620100, Russian Federation. Email: polinakrutikova1610@gmail.com.

Tikhonova Natalia Valeryevna — Doctor of Technical Sciences, Professor, Head of the Department of Food Engineering of Agricultural Production, Ural State Agrarian University, Yekaterinburg. E-mail kaf.zooin@urgau.ru.

Styagov Nikolay Nikolaevich — Master's student, Ural State Forestry University. 37Sibirskiytrakt, Yekaterinburg, 620100, Russian Federation. Email: nstyagov@gmail.com.