

УДК 636.03

С. Л. Тихонов^{1,2}, Н. В. Тихонова¹

**РАЗРАБОТКА И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ
НОВОГО АНТИТРОМБОЦИТАРНОГО
ПИЩЕВОГО ПЕПТИДА**

81

¹ Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия

² Уральский государственный лесотехнический университет,

Екатеринбург, Россия

Поступила в редакцию 30.04.2024 г.

Принята к публикации 16.06.2024 г.

doi: 10.5922/vestniknat-2024-3-6

Для цитирования: Тихонов С. Л., Тихонова Н. В. Разработка и прогнозирование токсичности нового антитромбоцитарного пищевого пептида // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Сер.: Естественные и медицинские науки. 2024. №3. С. 81 – 88. doi: 10.5922/vestniknat-2024-3-6.

Разработку антитромбоцитарного пептида проводили с использованием протеомных баз данных и базы данных циклических пептидов Cybase. Прогнозирование токсичности осуществляли на платформе ADMET1 ab 3. В качестве каркаса был применен циклический пептид с названием PLP-5 под номером 1375 в базе данных циклических пептидов Cybase. Получен новый пептид с аминокислотной последовательностью QLSNGLFVDYLWW. По предсказателю биологической активности пептидов он имеет биоактивность на уровне 0,81968 ед. при максимальной 1. Пептид не вызывает острую токсичность при пероральном применении, не токсичен для сердца, печени, слизистых глаз и дыхательных путей, не мутагенен, не цитотоксичен, что позволяет его рекомендовать в качестве функционального ингредиента для пищевой продукции специализированного назначения, но при условии подтверждения эффективности в экспериментах in vitro.

Ключевые слова: циклические пептиды, антитромботические свойства, биологическая активность, токсичность, цитотоксичность

Введение

Заболевания сердечно-сосудистой системы являются одной из основных причин смертности [1]. Осложнением таких заболеваний может быть тромбоз, приводящий к развитию ишемического инсульта, инфаркта миокарда и других патологий [2]. Для предупреждения образования тромбов используются антитромбоцитарные препараты, в частности



аспирин. В основном такие лекарственные препараты вызывают ряд побочных эффектов, что ограничивает их применение [3]. Поэтому создание новых биологически активных веществ с антитромбоцитарным действием остается важным направлением биотехнологических исследований. Но прежде чем создавать вышеуказанные биоактивные вещества, целесообразно рассмотреть механизм образования тромбов для обоснования наличия предлагаемых действующих начал.

В образовании тромбов участвует молекула клеточной адгезии, связанная с карциноэмбриональным антигеном 1 (CEACAM1). Это трансмембранный гликопротеин, экспрессируемый в тромбоцитах, эндотелиальных клетках и иммунных клетках [4]. Клетки эндотелия, эпителия и лимфоциты экспрессируют антигены CEACAM1-4I и CEACAM1-4S [5], включающие N-конец иммуноглобулиноподобного домена V (IgV) (N домен) и три константных региона иммуноглобулина типа 2 (IgC2)-подобные домены (домены A1, B и A2). Различия в изоформах лежат во внутриклеточных цитоплазматических хвостах CEACAM1-4I и CEACAM1-4S. Хвост CEACAM1-4I включает два ингибирующих мотива иммунорецепторов на основе тирозина (ITIMs), тогда как хвост CEACAM1-4S этого не делает, но имеет последовательности для кальмодулина и тропомиозина и может взаимодействовать с цитоскелетом [6]. В исследованиях на лабораторных мышах с недостатком CEACAM1 авторами [7; 8] установлено, что CEACAM1 препятствует взаимодействию белка коллагена и тромбоцитов.

Рецептором коллагена в тромбоцитах считается мембранный белок – гликопротеин VI (GPVI). При повреждении стенки сосудов обнажается коллаген матрикса и происходит его связывание с GPVI, что приводит к активации тромбоцитов. GPVI опосредует активацию сигнальных путей, созданных на мотиве активации иммунорецепторов на основе тирозина (ITAM), и способствует внутриклеточной мобилизации Ca_{2+} и изменению формы тромбоцитов [9]. GPVI индуцирует секрецию тромбоцитами аденозиндифосфата (АДФ), тромбоксана и растворимых агонистов тромбоцитов, которые дополнительно активируют кровообращение и притягивают тромбоциты к поврежденной поверхности стенки сосуда [10]. Сигнальные молекулы цитоплазмы тромбоцитов передают сигнал интегрину $\alpha IIb\beta 3$ (GP IIb / IIIa), который принимает высокоаффинную конформацию, позволяющую ему связываться с фибриногеном, то есть происходит активации тромбоцитов и образуются тромбы [11].

Следовательно, для предотвращения тромбоза необходимо ослабить функцию рецептора GPVI и разрушить CEACAM1. Механизм действия новых антитромботических веществ должен быть направлен на рецептор гликопротеина GPVI и белок CEACAM1.

В исследовании [12] установлено, что металлопептидаза-12 (MMP-12) гидролизует CEACAM1 на пептиды. Один из этих пептидов – QLSNGNRTLT – ингибирует индуцированную коллагеном активацию тромбоцитов [13], другой пептид QDTTYLWW предотвращает опосредованную GPVI активацию тромбоцитов и образование тромба [14]. Пептидные фрагменты QLSN и YLWW наиболее активны в механизме предотвращения образования тромбов [13; 14].



Одним из недостатков пептидов является их протеолиз в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и, соответственно, снижение биодоступности и эффективности. Для решения этой проблемы пептиды можно трансплантировать в устойчивый к ферментализу белковый циклоидный каркас [15].

Перед синтезом биологически активных пептидов необходимо оценить их токсичность. В связи с этим целью исследования является создание нового антитромботического, устойчивого к протеолизу в ЖКТ пептида и прогнозирование его токсичности.

Материал и методы исследования

Разработку антитромбоцитарного пептида проводили с использованием протеомных баз данных DRAMP (<http://dramp.cpu-bioinform.org/>), APD 3 (<https://aps.unmc.edu/home>) и базы данных циклических пептидов Cybase (<http://www.cybase.org.au>). Сравнение пептида с существующими осуществляли по пептидной базе EROP-Moscow (<http://erop.inbi.ras.ru/index.html>), включающей 26700 пептидов различной функциональной направленности. Прогноз биологической активности пептида проводили с помощью пептидного предсказателя Peptide Ranker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker>). Прогнозирование токсичности осуществляли на платформе ADMET1 ab 3 (<https://admetlab3.scbdd.com/documentation/#/>).

Результаты

По результатам исследований [13; 14] аминокислотные последовательности QLSN и YLWW в антитромботических пептидах QLSNGNRTLT и QDTTYLWW препятствуют образованию тромбов [13; 14], поэтому для создания нового антитромботического пептида были использованы вышеуказанные последовательности. Следует отметить, что некоторые пептиды теряют свою активность под действием высоких температур [16], что делает невозможным их применение в качестве функциональных ингредиентов в составе пищевой продукции, технология которых включает пастеризацию и стерилизацию. Кроме того, пептиды подвергаются ферментативному гидролизу в ЖКТ и теряют свои биологические свойства. Поэтому при создании биопептидов используют каркасы циклических пептидов, устойчивые к протеолизу и температурному воздействию [17]. В качестве каркаса был использован циклический пептид с названием PLP-5 под номером 1375 в базе данных циклических пептидов Cybase.

На рисунке представлена протеомная карта циклического пептида PLP-5.

Пептид PLP-5 состоит из 5 аминокислотных остатков со следующей последовательностью GLFVD и имеет молекулярную массу 531,61 Да.

На основе циклического пептида и антитромботических последовательностей был получен новый пептид со следующей аминокислотной последовательностью: QLSNGLFVDYLWW.

По предсказателю биологической активности пептидов он имеет биоактивность 0,81968 при максимальной 1.



The Database of



Карточка белка PLP-5(1375)

ДОБРО ПОЖАЛОВАТЬ

Библиография
Ссылки
О нас
Ссылки

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Поиск
Соответствие
Праймеру

БЕЛКИ

Классы >
Поиск
Поиск по отпечаткам пальцев
Поиск по циклу
Инструменты >
Виды растений, лишённые циклотидов

СТРУКТУРЫ

Поиск

Общая информация

Имя	PLP-5
Последовательность	GLFVD
Класс	Орбитальная
Техника	Геномный
Средняя масса	531.61
Моноизотопная масса	531.27
m/z M +H	532.28
Тип белка	Дикий тип
Родитель	
Организм	<i>Senecio pinnatifolius</i> var <i>морской</i>
Примечания	
Циклический	ДА

Анализ

Анализы не найдены

Ссылки

Фишер, М.Ф., Чжан, Дж., Тейлор, Н.Л., Ховард, М.Дж., Берковиц, О., Дебовски, А.В., Бехсаз, Б., Уилан, Дж., Певзнер, П.А. и Майлн, Дж.С. (2018) Семейство небольших циклических пептидов, погребённых в препроальбумине с эпохи эоцена, *Растительный прямой* 2:0-0

Рис. Протеомная карта циклического пептида PLP-5

Пептид не имеет совпадений в базе данных EROP-Moscow, что свидетельствует о его идентичности.

В таблице представлены результаты прогнозирования токсичности пептида QLSNGLFVDYLWW на платформе ADMET1 ab 3.

Результаты прогнозирования токсичности пептида

GRCTKSICHFRWPGPPICFPD

Прогнозируемый показатель токсичности	Полученное значение	Описание значения / оценка токсичности
hERG-блокаторы, ед.	0,01	Не являются hERG-блокаторами при менее 0,3 / не токсичен для сердца
DILI, ед.	0,004	Не является токсичным для печени при значении менее 0,3 / не гепатотоксичен
Тест Эймса, ед.	0,073	Не мутагенен и не канцерогенен при значении менее 0,3 / не токсичен



Прогнозируемый показатель токсичности	Полученное значение	Описание значения / оценка токсичности
Острая токсичность при введении внутрь крысам, ед.	0,091	Не токсичен при значении менее 0,3 (> 500 мг/кг) / не токсичен при пероральном применении
Раздражение слизистой оболочки глаз, ед.	0,0	Не вызывает раздражение слизистой оболочки глаз при значении менее 0,3 / не токсичен для глаз
Раздражение слизистой органов дыхательной системы, ед.	0,0	Не вызывает раздражение слизистой дыхательных путей при значении менее 0,3 / не токсичен для дыхательной системы
Гематотоксичность, ед.	0,006	Не гематотоксичен при значении менее 0,3 / не гематотоксичен
Иммунотоксичность RPMI-8226, ед.	0,002	Не иммунотоксичен при значении менее 0,3 / не иммунотоксичен
Цитотоксичность Нек293, ед.	0,001	Не цитотоксичен при значении менее 0,3 / не цитотоксичен
IGC50, log ₁₀ [(мг/л)/(1000·МВТ)]	3,55	При значении 0–5 не токсичен / не токсичен

Участвующий в реполяризации сердца hERG представляет собой калиевый канал, управляемый напряжением. Нецелевое ингибирование hERG лекарственными средствами стало критической проблемой в фармацевтической промышленности [18]. В результате исследований установлено, что пептид не вызывает блокирование канала hERG и, соответственно, не оказывает токсического действия на сердце.

Лекарственно индуцированное повреждение печени (dili), как внутреннее, так и идиосинкразическое, является частой причиной заболеваемости, смертности, неудач в клинических испытаниях и отмены после одобрения многих лекарственных препаратов [19]. Установлено, что исследуемый пептид является dili-отрицательным, соответственно, не вызывает повреждение печени.

Анализ мутагенности с использованием теста Эймса может предоставить ценную информацию о токсичности поглощенных ксенобиотиков. По прогнозированию теста Эймса установлено, что пептид не обладает мутагенностью.

На лабораторных крысах спрогнозировано, что пептид при пероральном применении не вызывает острую токсичность. Исследуемый пептид не раздражает слизистые оболочки глаз и дыхательных путей.

Фактические данные подчеркивают растущую важность исследования гематологической токсичности как наиболее частого общепринятого терминологического критерия нежелательных явлений после Т-клеточной терапии [20]. Установлено, что исследуемый пептид не обладает гематотоксичностью и иммунотоксичностью.

Клеточная линия НЕК293 используется в качестве производителя биотерапевтических средств и для оценки токсичности новых химиче-



ских веществ. Помимо простоты роста в бессывороточной суспензионной культуре и способности к трансфекции наиболее важным свойством этой клеточной линии является ее человеческое происхождение, что делает ее пригодной для оценки токсичности биологических препаратов, предназначенных для использования человеком [21]. Установлено, что исследуемый пептид не токсичен в отношении клеток НЕК293.

Заключение

Получен антитромботический пептид на основе каркаса циклического устойчивого пептида. Спрогнозировано, что новый пептид QLSNGLFVDYLWW обладает высокой биологической активностью, не вызывает острой токсичности при пероральном применении, не токсичен для сердца, печени, слизистых глаз и дыхательных путей, не мутагенен, не цитотоксичен, что позволяет его рекомендовать в качестве функционального ингредиента для пищевой продукции специализированного назначения, но при условии подтверждения эффективности в экспериментах *in vitro*.

Список литературы

1. Nagareddy P., Smyth S.S. Inflammation and thrombosis in cardio-vascular disease // *Curr Opin Hematol*. 2013. Vol. 20, №5. P. 457–463. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328364219d>.
2. Koupenova M., Clancy L., Corkrey H. A., Freedman J. E. Circulating platelets as mediators of immunity, inflammation, and thrombosis // *Circ Res*. 2018. Vol. 122, №2. P. 337–351. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310795>.
3. Mackman N., Bergmeier W., Stouffer G. A., Weitz J. I. Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches // *Nat Rev Drug Discov*. 2020. Vol. 19, №5. P. 333–352. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0061-0>.
4. Kim W. M., Huang Y. H., Gandhi A., Blumberg R. S. CEACAM1 structure and function in immunity and its therapeutic implications // *Semin Immunol*. 2019. Vol. 42. P. 101296. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101296>.
5. Prall F., Nollau P., Neumaier M. et al. CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues // *J Histochem Cytochem*. 1996. Vol. 44, №1. P. 35–41. <https://doi.org/10.1177/44.1.8543780>.
6. Schumann D., Chen C. J., Kaplan B., Shively J. E. Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 directly associates with cytoskeleton proteins actin and tropomyosin // *J Biol Chem*. 2001. Vol. 276, №50. P. 47421–47433. doi: 10.1074/jbc.M109110200.
7. Wong C., Liu Y., Yip J. et al. CEACAM1 negatively regulates platelet-collagen interactions and thrombus growth in vitro and in vivo // *Blood*. 2009. Vol. 113, №8. P. 1818–1828. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-165043>.
8. Stern N., Markel G., Arnon T. I. et al. Carcinoembryonic antigen, №CEA) inhibits NK killing via interaction with CEA-related cell adhesion molecule 1 // *J Immunol*. 2005. Vol. 174, №11. P. 6692–6701. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.6692>.
9. Nieswandt B., Watson S. P. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? // *Blood*. 2003. Vol. 102, №2. P. 449–461. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-12-3882>.
10. Stalker T. J., Newman D. K., Ma P. Platelet signaling // *Handb Exp Pharmacol*. 2012. Vol. 210. P. 59–85. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5>.



11. Watson S.P., Auger J.M., McCarty O.J., Pearce A.C. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets // *J Thromb Haemost.* 2005. Vol. 3, №8. P. 1752–1762. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01429.x>.

12. Wang J., Ye Y., Wei G. et al. Matrix metalloproteinase12 facilitated platelet activation by shedding car-cinoembryonic antigen related cell adhesion molecule1 // *Biochem Biophys Res Commun.* 2017. Vol. 486, №4. P. 1103–1109. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.001>.

13. Ye Y., Wan W., Wang J. et al. The CEACAM1-derived peptide QLSN impairs collagen-induced human platelet activation through glycoprotein VI // *Biosci Biotechnol Biochem.* 2020. Vol. 84, №1. P. 85–94. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1662277>.

14. Ye Y., Leng M., Chai S. Antiplatelet effects of the CEACAM1-derived peptide QDTT // *Platelets.* 2024. Vol. 35, №1. P. 2308635. doi: 10.1080/09537104.2024.2308635.

15. Jaradat D.M. Solid-Phase Peptide Cyclization with Two Disulfide Bridges // *Methods Mol Biol.* 2022. Vol. 2371. P. 19–29.

16. Lovelock S.L., Crawshaw R., Basler S. et al. The road to fully programmable protein catalysis // *Nature.* 2022. Vol. 606. P. 49–58. doi: 10.1038/s41586-022-04456-z.

17. Jacob B., Vogelaar A., Cadenas E., Cama-rero J.-A. Using the cyclotide scaffold for targeting biomolecular interactions in drug development // *Molecules.* 2022. Vol. 27. P. 6430. <https://doi.org/10.3390/molecules27196430>.

18. Asai T., Adachi N., Moriya T. Cryo-EM Structure of K⁺-Bound hERG Channel Complexed with the Blocker Astemizole // *Structure.* 2021. Vol. 29, №3. P. 203–212. e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.12.007>.

19. Zhang C.J., Meyer S.R., O'Meara M. A human liver organoid screening platform for DILI risk prediction // *J Hepatol.* 2023. Vol. 78, №5. P. 998–1006. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.01.019>.

20. Rejeski K., Perez A., Sesques P. et al. CAR-HEMATOTOX: a model for CAR T-cell-related hematologic toxicity in relapsed / refractory large B-cell lymphoma // *Blood.* 2021. Vol. 138, №24. P. 2499–2513.

21. Abaandou L., Quan D., Shiloach J. Affecting HEK293 Cell Growth and Production Performance by Modifying the Expression of Specific Genes // *Cells.* 2021. Vol. 10, №7. P. 1667. <https://doi.org/10.3390/cells10071667>.

Об авторах

Сергей Леонидович Тихонов — д-р техн. наук, проф., проф. кафедры пищевой инженерии аграрного производства, директор научно-образовательного центра «Прикладные нанобиотехнологии», Уральский государственный аграрный университет; проф. кафедры пищевой химической технологии древесины, биотехнологии и наноматериалов, Уральский государственный лесотехнический университет, Россия.

E-mail: tihonov75@bk.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

Наталья Валерьевна Тихонова — д-р техн. наук, проф., зав. кафедрой пищевой инженерии аграрного производства, Уральский государственный аграрный университет, Россия.

E-mail: tihonov75@bk.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5841-1791>



S. L. Tikhonov^{1,2}, N. V. Tikhonova¹

DEVELOPMENT AND PREDICTION OF TOXICITY
OF A NEW ANTIPLATELET FOOD PEPTIDE

¹ Ural State Agrarian University, Ekaterinburg, Russia

² Ural State Forestry Engineering University, Ekaterinburg, Russia

Received 30 April 2024

Accepted 16 June 2024

doi: 10.5922/vestniknat-2024-3-6

88

To cite this article: Tikhonov S. L., Tikhonova N. V., 2024, Development and prediction of toxicity of a new antiplatelet food peptide, *Vestnik of Immanuel Kant Baltic Federal University. Series: Natural and Medical Sciences*, №3 P. 81 – 88. doi: 10.5922/vestniknat-2024-3-6.

The development of an antiplatelet peptide was conducted using proteomic databases and the Cybase cyclic peptide database. Toxicity prediction was carried out on the ADMETlab 3.0 platform. The framework used was the cyclic peptide PLP-5, listed under number 1375 in the Cybase database. A new peptide with the amino acid sequence QLSNGLFVDYLWW was obtained. According to the peptide bioactivity predictor, it has a bioactivity level of 0.81968 units, with a maximum of 1. The peptide does not cause acute toxicity when administered orally, is non-toxic to the heart, liver, eye mucosa, and respiratory tract, is non-mutagenic, and non-cytotoxic. This allows it to be recommended as a functional ingredient for specialized food products, provided its effectiveness is confirmed in in vitro experiments.

Keywords: cyclic peptides, antithrombotic properties, biological activity, toxicity, cytotoxicity

The authors

Prof. Sergey L. Tikhonov, Ural State Agrarian University; Ural State Forest Engineering University, Russia.

E-mail: tihonov75@bk.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

Prof. Natalya V. Tikhonova, Ural State Agrarian University, Russia.

E-mail: tihonov75@bk.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5841-1791>