

## О РОЛИ ПРЯМОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ В МЕХАНИЗМЕ АНТИЛИТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ТРИПЕПТИДА LEU-ILE-LYS

<sup>1</sup>Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск

Жариков А.Ю.<sup>1,2</sup>, Мазко О.Н.<sup>1</sup>, Макарова О.Г.<sup>1</sup>, Госсен И.Е.<sup>1</sup>, Якушев Н.Н.<sup>1</sup>, Жарикова Г.В.<sup>1</sup>

*Установлено, что трипептид Leu-Ile-Lys обладает выраженным антилитогенным эффектом, который, предположительно, носит мембранотропный характер. Вероятно, он может быть обусловлен прямым антиоксидантным действием трипептида. Теоретические расчеты количественных отношений между структурой и активностью Leu-Ile-Lys подтверждают такую возможность. Мы решили изучить прямой антиоксидантный эффект трипептида Leu-Ile-Lys, чтобы оценить его вклад в механизм антилитогенного действия. Цель исследования – изучить влияние трипептида Leu-Ile-Lys на общую антиоксидантную активность и общую прооксидантную активность в условиях in vitro.*

*Материалы и методы. Использовались субстанции трипептида Leu-Ile-Lys и дипептида карнозин (препарат сравнения). Изготавливались их растворы в концентрациях 2, 4 и 8 мг/мл. Определялась общая антиоксидантная (ОАА) и общая прооксидантная активность (ОПА) in vitro. ОАА определяли по способности угнетать Fe<sup>2+</sup>/аскорбат-индуцированное окисление ТВИН-80. ОПА оценивали по интенсивности окраски продуктов взаимодействия ТВИН-80 с тиобарбитуровой кислотой.*

*Результаты и обсуждение. Установлено, что ОАА карнозина последовательно возрастала в 6,9 раза, а ОПА последовательно снижалась в 6,7 раза. ОАА трипептида Leu-Ile-Lys увеличивалась в 2–2,8 раза при сопутствующем увеличении ОПА в 2,3–4,9 раза. Для всех разведений ОАА трипептида статистически значимо уступала уровню карнозина, а ОПА в разведениях 4 и 8 мг/мл статистически значимо превышала уровень карнозина. По-видимому, прямое антиоксидантное действие трипептида Leu-Ile-Lys незначительно и не может объяснить его антилитогенное действие.*

*Заключение. В сравнении с карнозином трипептид Leu-Ile-Lys обладает незначительным прямым антиоксидантным эффектом.*

**Ключевые слова:** трипептид Leu-Ile-Lys, прямой антиоксидантный эффект, механизм антилитогенного действия.

## ON THE ROLE OF DIRECT ANTIOXIDANT ACTIVITY IN THE MECHANISM OF ANTI-LITHOGENIC ACTION OF TRIPEPTIDE LEU-ILE-LYS

<sup>1</sup>Altai State Medical University, Barnaul

<sup>2</sup>Scientific-Research Institute of Physiology and Basic Medicine, Novosibirsk

A.Yu. Zharikov<sup>1,2</sup>, O.N. Mazko<sup>1</sup>, O.G. Makarova<sup>1</sup>, I.E. Gossen<sup>1</sup>, N.N. Yakushev<sup>1</sup>, G.V. Zharikova<sup>1</sup>

*Tripeptide Leu-Ile-Lys has been found to have a pronounced anti-lithogenic effect, which is presumably membrane trophic in nature. It can probably be due to the direct antioxidant action of the tripeptide. Theoretical calculations of the quantitative relationship between Leu-Ile-Lys structure and activity confirm this possibility. We decided to study the direct antioxidant effect of the tripeptide Leu-Ile-Lys to assess its contribution to the mechanism of anti-lithogenic action. The research objective was to study the effect of the tripeptide Leu-Ile-Lys on total antioxidant status and total prooxidant status under in vitro conditions.*

*Materials and methods. Tripeptide Leu-Ile-Lys and dipeptide carnosine (comparison drug) substances were used. Their solutions were made in concentrations of 2, 4 and 8 mg/ml. Total antioxidant (TAS) and total prooxidant (TPS) statuses were determined in vitro. TAS was determined by the ability to inhibit FE<sup>2+</sup>/ascorbate-induced oxidation of Tween-80. TPS was evaluated by the intensity of staining of products of Tween-80 interaction with thiobarbituric acid.*

*Results and discussion. It was found that carnosine TAS consistently increased by 6.9 times, and TPS consistently decreased by 6.7 times. Tripeptide Leu-Ile-Lys TAS increased by 2–2.8 times with a concomitant increase in TPS by 2.3–4.9 times. For all dilutions, tripeptide TAS was statistically significantly inferior to carnosine levels, and TPS in dilutions of 4 and 8 mg/ml statistically significantly exceeded carnosine levels. Apparently, the direct antioxidant*

*effect of tripeptide Leu-Ile-Lys is negligible and cannot explain its anti-lithogenic effect.*

*Conclusion. In comparison with carnosine, tripeptide Leu-Ile-Lys has a minor direct antioxidant effect.*

*Keywords: tripeptide Leu-Ile-Lys, direct antioxidant effect, mechanism of anti-lithogenic action.*

Ранее в экспериментах на животных нами был выявлен выраженный антилитогенный эффект трипептида Leu-Ile-Lys при 6-недельном оксалатном нефролитиазе [1, 2]. Затем данный эффект был подтвержден в условиях хронического 16-недельного экспериментального оксалатного нефролитиаза [3].

Исходя из полученных данных биохимического исследования функций почек подопытных крыс в указанных экспериментах, возникло предположение, что механизм антилитогенного эффекта трипептида может быть напрямую или косвенно обусловлен его мембранотропным действием, на что в том числе указывало снижение концентрации в почках тиобарбитуратреактивных продуктов – основного продукта перекисного окисления мембранных фосфолипидов [1].

Не исключено, что это могло происходить вследствие прямого антиоксидантного эффекта трипептида Leu-Ile-Lys. Возможность наличия такого эффекта имеет расчетное подтверждение. Так, расчеты количественных отношений между структурой и активностью (QSAR) для потенциальных антиоксидантных трипептидов показали, что структура пептида Leu-Ile-Lys имеет положительный антиоксидантный потенциал, а именно: условный вклад аминокислоты лейцин в положении 1 составил плюс 0,05, аминокислоты изолейцин в положении 2 – плюс 0,4, аминокислоты лизин в положении 3 – минус 0,1 [4].

Учитывая вышесказанное, мы решили изучить прямое влияние трипептида Leu-Ile-Lys на активность процесса свободнорадикального окисления, чтобы оценить его вклад в механизм антилитогенного действия пептида.

Таким образом, цель исследования – изучить влияние трипептида Leu-Ile-Lys на общую антиоксидантную активность и общую прооксидантную активность в условиях *in vitro*.

### Материалы и методы

Для проведения экспериментов была использована субстанция трипептида Leu-Ile-Lys, полученная методом химического синтеза на предприятии SHANGHAI APEPTIDE CO., LTD (г. Шанхай, Китайская народная республика) при посредничестве ЗАО «Эвалар». Чистота образца составила не менее 98%. В качестве препарата сравнения использовали карнозин – дипептид Ala-His с широко известными свойствами прямого пептидного антиоксиданта [5, 6]. Субстанция карнозина с чистотой не менее 98% была получена от ЗАО «Эвалар».

Для каждого пептида были приготовлены растворы в трех разведениях с концентрациями 2 мг/мл, 4 мг/мл и 8 мг/мл. Это растворы использовались для изучения общей антиоксидантной активности и общей прооксидантной активности в условиях *in vitro*.

Общую антиоксидантную активность (ОАА) определяли по способности пептида угнетать Fe<sup>2+</sup>/аскорбат-индуцированное окисление ТВИН-80. Суммарный показатель концентрации всех прооксидантов и свободно-радикальных метаболитов, общую прооксидантную активность (ОПА) оценивали по интенсивности окраски флуоресцентного комплекса, образующегося при взаимодействии продуктов перекисного окисления ТВИН-80 с тиобарбитуровой кислотой [7, 8]. Для всех растворов измерения проводили на 20 образцах. По итогам измерений рассчитывали индекс соотношения ОАА/ОПА.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием компьютерной программы STATISTICA 13.3.1. (лицензия JPZ906I448517FAACD-K). Результаты исследований представлены медианой и интерквартильным размахом (Me (25%;75%)). Статистические сравнения между группами проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни [9].

### Результаты и обсуждение

Проведенные эксперименты показали, что препарат сравнения карнозин, как и ожидалось, продемонстрировал выраженные свойства прямого антиоксиданта (рисунок 1). Так, в концентрации раствора карнозина 2 мг/мл ОАА составила 10,0 (7,3;12,3) %, а ОПА – 41,0 (39,0;44,4) %. Индекс ОАА/ОПА=0,24. При увеличении концентрации карнозина в растворе в 2 раза его ОАА увеличилась в 4 раза и составила 40,7 (28,9;51,9) %. ОПА при этом, напротив, уменьшилась в 2,2 раза до значения 18,7 (10,0;26,0) %. Индекс ОАА/ОПА=2,2. В максимальной концентрации (8 мг/мл) ОАА раствора карнозина равнялась 68,9 (67,7;70,1) %, ОПА – 6,1 (3,8;7,9) %. Индекс ОАА/ОПА=11,3.

Как показано на рисунке 2, ОАА раствора трипептида Leu-Ile-Lys в концентрации 2 мг/мл составила 6,5 (6,2;7,6) %, что было меньше, чем у раствора карнозина, в 1,5 раза (p=0,008). ОПА равнялась 12,5 (6,1;17,2) %, уступая уровню препарата сравнения в 3,3 раза (p<0,001). Индекс ОАА/ОПА для раствора трипептида Leu-Ile-Lys в концентрации 2 мг/мл составил 0,52. ОАА раствора трипептида Leu-Ile-Lys в концентрации

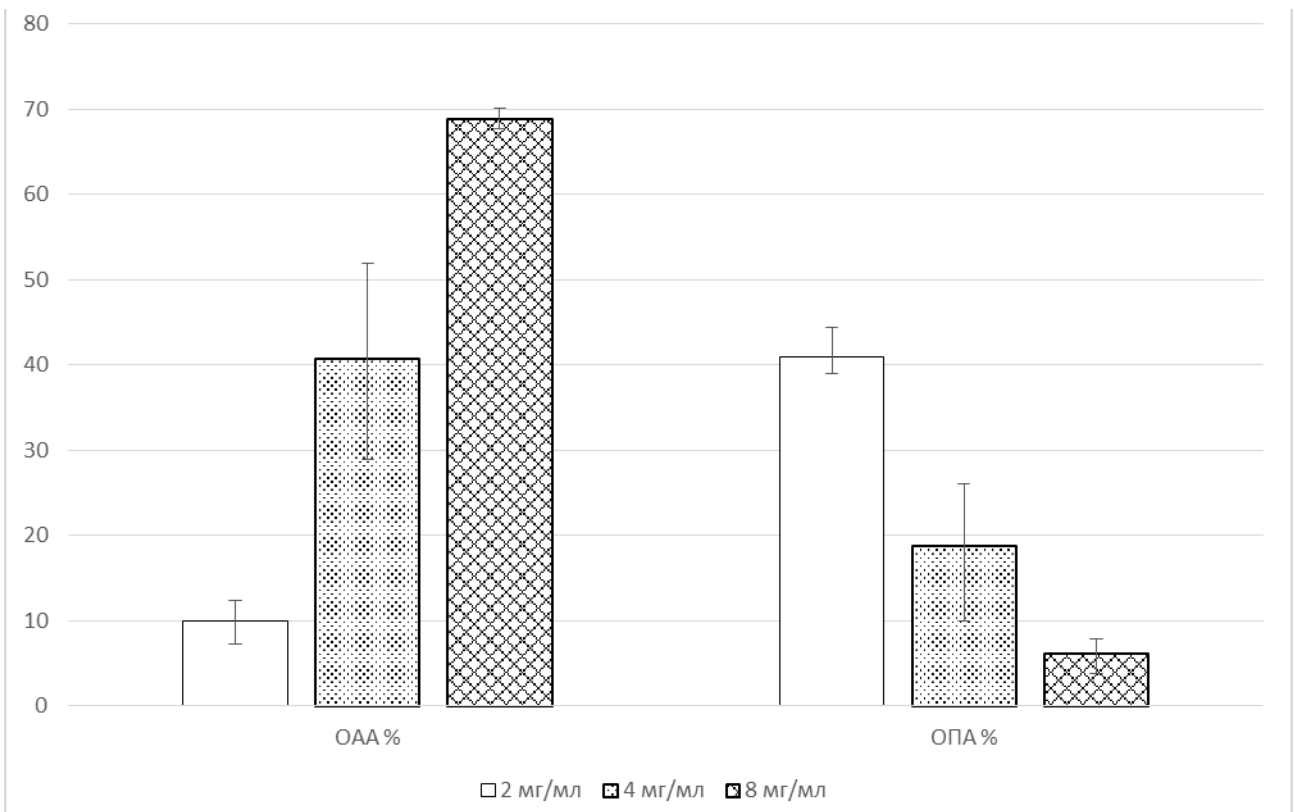


Рисунок 1 – Динамика общей антиоксидантной активности и общей прооксидантной активности растворов карнозина. «Легенда»: по горизонтальной оси – название показателя и единицы измерения. По вертикальной оси – значение показателя. Значения представлены в виде медианы и интерквартильного размаха.

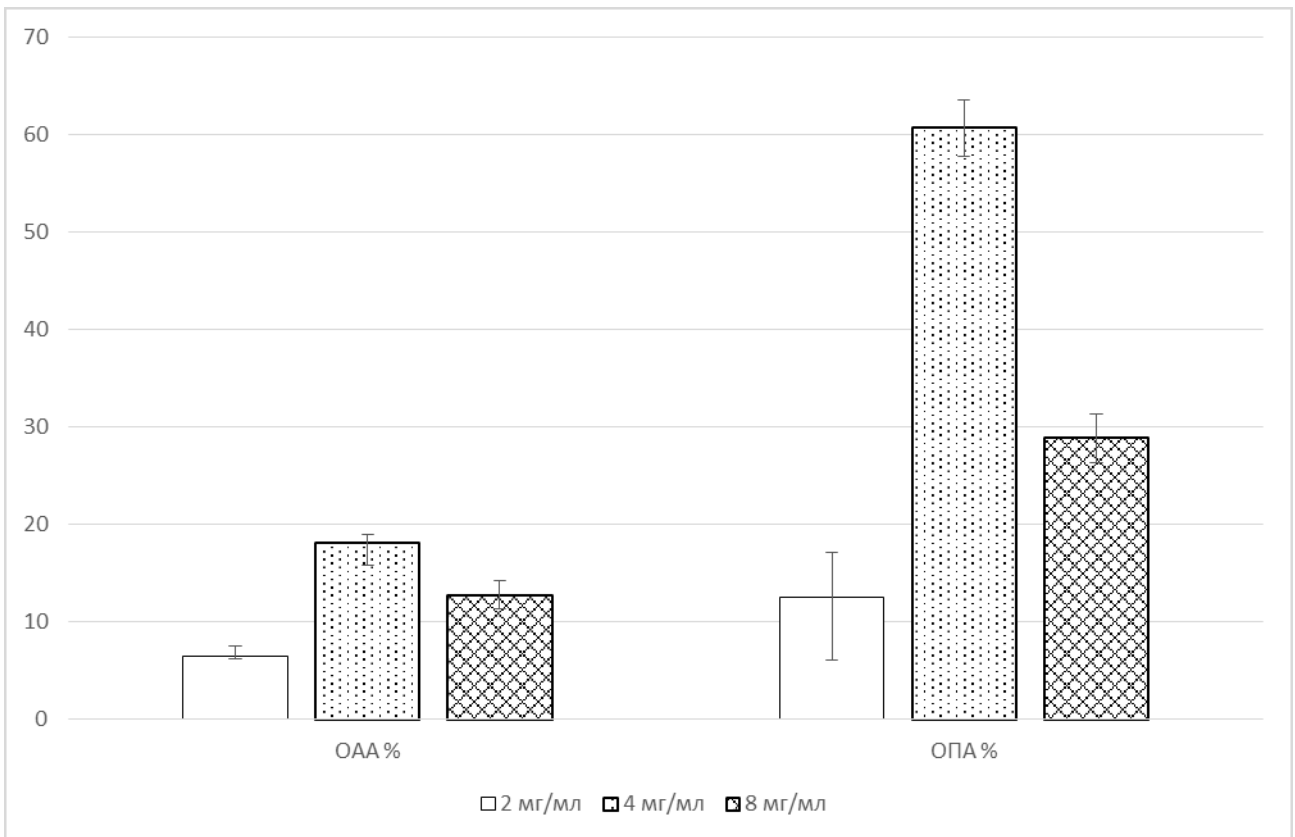


Рисунок 2 – Динамика общей антиоксидантной активности и общей прооксидантной активности растворов трипептида Leu-Phe-Lys. «Легенда»: по горизонтальной оси – название показателя и единицы измерения. По вертикальной оси – значение показателя. Значения представлены в виде медианы и интерквартильного размаха.

4 мг/мл увеличилась в 2,8 раза и составила 18,1 (15,8;19,0) %, что, однако, было ниже уровня препарата сравнения в 2,2 раза ( $p < 0,001$ ). При этом у раствора трипептида существенно возросла и ОПА, составив 60,8 (57,8;63,6) %, что превышало величину данного показателя у карнозина в 3,3 раза ( $p < 0,001$ ). Индекс ОАА/ОПА=0,30. В концентрации 8 мг/мл ОАА раствора трипептида Leu-Ile-Lys несколько снизилась и равнялась 12,7 (11,4;14,2) %, уступая уровню препарата сравнения уже в 5,4 раза ( $p < 0,001$ ). ОПА раствора трипептида при этом также снизилась (28,9 (26,3;31,3) %), но по-прежнему превышала ОПА раствора карнозина – в 4,7 раза ( $p < 0,001$ ). Индекс ОАА/ОПА=0,44.

### Заключение

В результате проведенных экспериментов установлено, что по мере увеличения концентрации раствора карнозина его ОАА последовательно и выражено возрастала, а ОПА столь же последовательно и выражено снижалась. Как следствие, наблюдалось значительное увеличение индекса ОАА/ОПА более 1, что свидетельствует о преобладании антиоксидантных свойств над прооксидантными. Это хорошо согласуется с известными свойствами карнозина как мощного прямого антиоксиданта и подтверждает корректность использования его в качестве препарата сравнения.

На этом фоне характер влияния трипептида Leu-Ile-Lys на ОАА и ОПА в условиях *in vitro* отличался. Так, наблюдалось некоторое увеличение ОАА при росте концентрации пептида в растворе, однако оно было менее выражено, чем у карнозина. Кроме того, рост ОАА сопровождался ростом и ОПА. По всей видимости, свойства прямого неферментного антиоксиданта у трипептида Leu-Ile-Lys не столь выражены, в связи с чем зафиксированные ранее благоприятные изменения в картине оксидативного стресса в почках при нефролитиазе на фоне лечения изучаемым трипептидом, вероятно, были обусловлены косвенным влиянием на системы антиоксидантной защиты клеток, характер которого еще предстоит изучить.

Отметим также, что фармакодинамика антилитогенного эффекта трипептида Leu-Ile-Lys, вполне возможно, в большей степени базируется на механизмах, не связанных с его антирадикальной активностью. Так, например, важную роль может играть выраженное снижение пересыщения мочи литогенными ионами кальция, обнаруженное нами в предыдущих экспериментах [2]. Разумеется, данные предположения нуждаются в детальном изучении, на что и будут направлены дальнейшие исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об

отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы:

1. Жариков А.Ю., Якушев Н.Н., Жарикова Г.В., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Лепилов А.В., Бобров И.П. Влияние трипептида Leu-Ile-Lys на течение экспериментального оксалатного нефролитиаза. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицине.* 2019;167(6): 704-708.
2. Жариков А.Ю., Якушев Н.Н., Жарикова Г.В. *Фармакологическое средство для лечения мочекаменной болезни* Пат. РФ № 2679120; опубли. 06.02.2019.
3. Жариков А.Ю., Якушев Н.Н., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Лепилов А.В., Бобров И.П., Жарикова Г.В., Киселев В.И. Опыт применения трипептида LEU-Ile-LYS для экспериментальной терапии хронического 16-недельного оксалатного нефролитиаза у крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицине.* 2020;169(2): 197-202.
4. Chen N., Chen JI., Yao B., Zhengguo Li. QSAR Study on Antioxidant Tripeptides and the Antioxidant Activity of the Designed Tripeptides in Free Radical Systems. *Molecules.* 2018; 3(6): 1407. DOI: 10.3390/molecules23061407
5. Ярыгина Е.Г., Прокопьева В.Д., Бохан Н.А. Окислительный стресс и его коррекция карнозином. *Успехи современного естествознания.* 2015; 4: 106-113.
6. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev.* 2013;93(4): 1803-1845. DOI: 10.1152/physrev.00039.2012.
7. Волобой Н.Л., Зверев Я.Ф., Брюханов В.М., Талалаева О.С., Замятина С.В., Зяблова О.Н., Смирнов И.В. Антиоксидантный и прооксидантный эффекты арбутина и гидрохинона в эксперименте *in vitro*. *Бюллетень сибирской медицины.* 2011;10(5): 41-44.
8. Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В. Жариков А.Ю., Талалаева О.С. *Методы доклинического (экспериментального) исследования влияния лекарственных средств на функцию почек.* Новосибирск. АИ Гео; 2013: 84.
9. Хафизьянова Р.Х., Бурькин И.М., Алеева Г.Н. *Математическая статистика в экспериментальной и клинической фармакологии.* Казань: Медицина; 2006: 374.

### References

1. Zharikov A.Yu., Yakushev N.N., Zharikova G.V., Mazko O.N., Makarova O.G., Lepilov A.V., Bobrov I.P. Influence of Leu-Ile-Lys tripeptide on experimental oxalate nephrolithiasis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2019;167(6): 704-708. (In Russ.)
2. Zharikov A.Yu., Yakushev N.N., Zharikova G.V. *Pharmacological agent for the treatment of*



urolithiasis. Patent of the RF No. 2679120; publication date 06.02.2019.

3. Zharikov A.Yu., Yakushev N.N., Mazko O.N., Makarova O.G., Lepilov A.V., Bobrov I.P. et al. Experience with tripeptide Leu-Ile-Lys for experimental therapy of chronic 16-week oxalate nephrolithiasis in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020;169(2): 197-202. (In Russ.)

4. Chen N., Chen J., Yao B., Zhengguo Li. QSAR Study on Antioxidant Tripeptides and the Antioxidant Activity of the Designed Tripeptides in Free Radical Systems. *Molecules*. 2018; 3(6): 1407. DOI: 10.3390/molecules23061407

5. Yarygina E.G., Prokopyeva V.D., Bokhan N.A. Oxidative stress and its correction with carnosine. *Advances in Current Natural Sciences*. 2015; 4: 106-113. (In Russ.)

6. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev*. 2013;93(4): 1803-1845. DOI: 10.1152/physrev.00039.2012.

7. Voloboy N.L., Zverev Ya.F., Bryukhanov V.M., Talalaeva O.S., Zamyatina S.V., Zyablova O.N., Smirnov I.V. Antioxidant and prooxidant effects of arbutin and hydroquinone in the experiment in vitro. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2011;10(5): 41-44. (In Russ.)

8. Bryukhanov V.M., Zverev Ya.F., Lampatov V.V. Zharikov A.Yu., Talalaeva O.S. *Methods of pre-clinical (experimental) research of the effect of medicines on renal function*. Novosibirsk. AI Geo; 2013: 84. (In Russ.)

9. Khafiziyanova R.Kh., Burykin I.M., Aleeva G.N. *Mathematical statistics in experimental and clinical pharmacology*. Kazan: Medicina; 2006: 374. (In Russ.)

#### Контактные данные

Автор, ответственный за переписку: Жариков Александр Юрьевич, д.б.н., доцент, заведующий кафедрой фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул; Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск.  
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40.  
Тел.: +79130825477.  
E-mail: zharikov\_a\_y@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-4884-220X>

#### Информация об авторах

Мазко Олеся Николаевна, к.б.н., доцент кафедры фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.  
656038, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126.

Тел.: (3852) 566891.

E-mail: olesia.mazko@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0001-7299-4516>

Макарова Олеся Геннадьевна, к.фарм.н., доцент кафедры фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656038, г. Барнаул, пер. Некрасова, 65.

Тел.: (3852) 566893.

E-mail: olesia552@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-7771-9468>

Госсен Иван Егорович, к.м.н., доцент кафедры фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656031, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126.

Тел.: (3852) 566891.

E-mail: gossen@agmu.ru

Якушев Николай Николаевич, к.м.н., доцент кафедры фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656031, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126.

Тел.: (3852) 566891.

E-mail: yakushevnn@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-4059-569X>

Жарикова Ганна Викторовна, к.б.н., преподаватель кафедры общей и биологической химии, клинической лабораторной диагностики Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656038, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126.

Тел.: (3852) 566938.

E-mail: ganna1704@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-3227-2348>

Поступила в редакцию 08.02.2021

Принята к публикации 26.03.2021

**Для цитирования:** Жариков А.Ю., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Якушев Н.Н., Жарикова Г.В. О роли прямой антиоксидантной активности в механизме антилитогенного действия трипептида Leu-Ile-Lys. *Бюллетень медицинской науки*. 2021;1(21): 94–98.

**Citation:** Zharikov A.Yu., Mazko O.N., Makarova O.G., Gossen I.E., Yakushev N.N., Zharikova G.V. On the role of direct antioxidant activity in the mechanism of anti-lithogenic action of tripeptide Leu-Ile-Lys. *Bulletin of Medical Science*. 2021;1(21): 94–98. (In Russ.)