

НОЦИСТАТИН И ПРОДУКТЫ ЕГО ПРОТЕОЛИЗА КАК ДВОЙНЫЕ МОДУЛЯТОРЫ КИСЛОТО-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ 3-ГО ТИПА (ASIC3), ОБЛАДАЮЩИЕ БОЛЕВЫМ И ОБЕЗБОЛИВАЮЩИМ ЭФФЕКТОМ

© 2023 Д.И. Осмаков^{1,2*}, Н.В. Тарасова², А.А. Недорубов³, В.А. Паликов⁴,
Ю.А. Паликова⁴, И.А. Дьяченко⁴, Я.А. Андреев^{1,2}, С.А. Козлов^{1*}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия; электронная почта: osmadim@gmail.com; serg@ibch.ru

² Институт молекулярной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России,
119991 Москва, Россия

³ Институт трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России, 119991 Москва, Россия

⁴ Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
142290 Пушкино, Россия

Поступила в редакцию 15.09.2023

После доработки 27.10.2023

Принята к публикации 30.10.2023

Нейропептид ноцистатин (NS) экспрессируется клетками нервной системы и нейтрофилами как часть белка-предшественника и может подвергаться ограниченному протеолизу путём поэтапной деградации. Ранее было показано, что NS крысы (rNS) способен активировать чувствительные к кислоте ионные каналы (ASIC), но этот эффект частично коррелирует с кислотной природой NS. В этой работе мы исследовали изменение свойств rNS в процессе его деградации как нейропептида путём сравнения rNS и двух его синтезированных фрагментов. Мы оценили их активность на каналах ASIC3 крысы, экспрессированных в ооцитах лягушки, и их эффект в болевых тестах на мышах. Мы показали, что rNS сочетает в себе свойства как положительных, так и отрицательных модуляторов ASIC3, что выражается в способности снижать стационарную десенситизацию канала в диапазоне pH 6,8–7,0 и уменьшении реакции канала на кислотные стимулы в диапазоне pH 6,0–6,9. Укороченный аналог (rNSΔ21, 21 аминокислотный остаток с N-конца) сохранил эффект только положительного модулятора ASIC3, в то время как пентапептид с C-конца (rNSΔ30) сохранил способность проявлять себя только как отрицательный модулятор ASIC3. Эта тенденция была подтверждена в тестах на животных, где rNS и rNSΔ21 индуцировали поведение, связанное с болью, а rNSΔ30 проявлял обезболивающий эффект. Таким образом, мы показали изменение направленности действия rNS при поэтапной деградации от молекулы, усиливающей боль, к обезболивающему средству, поэтому конечный пентапептид можно даже рассматривать как многообещающую отправную точку для дальнейшей разработки лекарственного средства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нейропептид, ноцистатин, ASIC-каналы, электрофизиология, боль, анальгезия.

DOI: 10.31857/S032097252312014X, **EDN:** NQUQTQ

ВВЕДЕНИЕ

Перспективными объектами для разработки инновационных препаратов являются ионные каналы, непосредственно участвующие в процессе ноцицепции. Среди этих ионных каналов особый интерес представляют кисло-

то-чувствительные ионные каналы (ASIC), которые селективны по отношению к катионам Na⁺ и экспрессируются в нейронах периферической и центральной нервной системы (ПНС и ЦНС). ASIC-каналы участвуют в обнаружении локальных изменений pH внеклеточной среды для активации болевого сигнала в ПНС,

Принятые сокращения: ПНС – периферическая нервная система; ASIC – кислото-чувствительные ионные каналы; NS – ноцистатин; rNS – крысиный ноцистатин; SD – стандартное отклонение; SSD – стационарная десенситизация.

* Адресат для корреспонденции.

а в ЦНС — в регуляции передачи сигнала между нейронами [1, 2]. Четыре гена млекопитающих кодируют шесть изоформ ASIC: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 и ASIC4 [3]. Изоформа ASIC1a преобладает в нейронах ЦНС, тогда как в нейронах ПНС преобладают изоформы ASIC1a и ASIC3 [4–6]. ASIC реагируют на кислотный стимул быстро активируемым и десенситизированным током, который при воздействии pH 7,3 или меньше может подвергаться стационарной десенситизации (SSD — состояние, в котором канал теряет чувствительность к сильному стимулу после воздействия слабого неактивирующего стимула). Изоформа ASIC3 дополнительно обладает способностью поддерживать неде-сенситизируемый ток (устойчивый компонент тока), продолжающийся до тех пор, пока применяется стимул [7, 8]. Присутствуя в нейронах ПНС, каналы ASIC3 являются важными участниками патофизиологических процессов, связанных с хронической и ишемической болью [9–11]. Высокая плотность ASIC на постсинаптических мембранах рассматривается как свидетельство их участия в тонкой настройке процесса синаптической передачи, поскольку высвобождение нейротрансмиттеров сопровождается локальным подкислением, достаточным для активации ASIC [12].

Помимо протонов, известно несколько лигандов, активирующих ASIC-каналы. К экзогенным лигандам относятся токсин MitTx из яда змеи *Micrurus tener tener*, активирующий ASIC1- и ASIC3-содержащие каналы [13], а также природный бисбензилизохинолиновый алкалоид линдолдхамин из растения *Laurus nobilis* и синтетический 2-гуанидин-4-метилхинолин (GMQ), активирующий каналы ASIC3 [14–16]. Эндогенные лиганды включают лизофосфатидилхолин [17], агматин [14], изохинолиновые алкалоиды тетрагидропапаверолин (ТГП) и ретикулин [18] и, наконец, нейропептид ноцистатин (NS). Показано, что крысиный ноцистатин (rNS) способен активировать все изоформы ASIC, а предварительная инкубация канала с пептидом приводит к ингибированию ответа на протонный стимул (эффект, аналогичный SSD) [19].

Некоторые эндогенные нейропептиды имеют ограниченное время жизни и ступенчатую деградацию [20], поэтому целью данного исследования был мониторинг активности пептида rNS длиной в 35 аминокислот во время его ступенчатой деградации. Здесь мы описываем модулирующее действие rNS и продуктов его деградации на каналы ASIC3, а также действие этих пептидов в болевых тестах на мышах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. NS и его фрагменты были синтезированы по индивидуальному заказу компанией «Shanghai Royobiotech Co., Ltd» (Китай; чистота > 95%). GMQ был получен от «Sigma-Aldrich» (Штайнхайм, Германия). Пептид Ugr9-1 был получен путём гетерологичной экспрессии в *Escherichia coli* [21]. Рабочие растворы пептидов для электрофизиологических экспериментов готовили в буфере ND96, значение pH этих растворов контролировали непосредственно перед экспериментами.

Этическое заявление. Экспериментальные процедуры в данном исследовании соответствовали Международным руководящим принципам для биомедицинских исследований с участием животных, изданным Всемирной организацией здравоохранения, а также рекомендациям ARRIVE (Исследования на животных: отчёты об экспериментах *in vivo*) и «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 18.03.1986). Институциональная комиссия по уходу и использованию животных (IACUC) Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (протокол № 351/2022 от 24 ноября 2022 г.) и Институциональная комиссия по контролю и использованию лабораторных животных филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (протокол № 891/22 от 17 мая 2022 г.) одобрили проведение экспериментов. Исследование проводилось на базе ветеринарной Лаборатории биологических исследований ФИБХ РАН в Пущино, Россия. Процедуры ухода за животными проводились в соответствии со стандартными операционными процедурами Лаборатории.

Выделение ооцитов *Xenopus laevis* и инъекция мРНК. Самок лягушек *X. laevis*, содержащихся при 20 ± 2 °C, анестезировали 0,17%-ным трикаин метансульфонатом (MS222), после чего небольшую часть яичника удаляли через разрез брюшной полости и помещали в среду ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ и 5 mM HEPES, титрованный до pH 7,4 с помощью NaOH). У прооперированных животных признаков послеоперационного дистресс-синдрома не наблюдалось. Для каждого животного интервал между операциями составлял не менее трёх месяцев. Соединительную ткань и элементы фолликулярной оболочки удаляли обработкой коллагеназой (1 мг/мл в среде ND96 без кальция)

в течение 2 ч при комнатной температуре. Отсортированные здоровые дефолликулированные ооциты IV и V стадий развития хранили в среде ND96 и вводили в них 8–10 нг мРНК через 16–18 ч после выделения. мРНК, синтезированную из плазмид PCi, содержащих изоформу крысиного ASIC3, вводили в ооциты с помощью системы микроинъекции Nanolitre 2000 («World Precision Instruments», Сарасота, США). После инъекции ооциты хранили 2–3 дня при 18 °С, а затем — до 7 дней при 15 °С в среде ND96 с добавлением гентамицина (50 мкг/мл).

Электрофизиологические записи. Токи ASIC3 для цельных клеток регистрировались с использованием метода двухэлектродной фиксации потенциала с помощью усилителя GeneClamp 500 («Axon Instruments», США) при удерживающем потенциале –50 мВ. Микроэлектроды заполняли 3 М раствором KCl. Внешний раствор представлял собой ND96 (pH 7,4, 7,3 и 7,2) и ND96, в котором 5 мМ HEPES был заменён на 5 мМ MOPS (pH 7,0, 6,9, 6,6). Активирующим раствором служил буфер ND96, в котором 5 мМ HEPES заменяли на 10 мМ MOPS с доведением pH до 7,0, 6,9, 6,8, 6,7 и 6,6 или на 10 мМ MES с доведением pH до 6,5, 6,0 и 5,5. Скорость потока и быстрая смена растворов в регистрационной камере контролировались собственной компьютерной клапанной системой. Данные фильтровались на частоте 10 Гц и оцифровывались на частоте 100 Гц с помощью АЦП L780 («LCard», Россия).

Анализ *in vivo*. Половозрелые мыши-самцы линии C57BL/6 в возрасте 8–10 недель (массой 21–23 г) с SPF-статусом были получены из племенного комплекса Института биоорганической химии РАН. Животных содержали в помещении барьерного типа с автоматической сменой дневного и ночного периодов (08:00–20:00 — «дневной», 20:00–08:00 — «ночной») и не менее чем 12-кратной сменой воздуха в помещении за час. В каждом помещении осуществлялся постоянный автоматический контроль температуры и влажности с помощью компьютеризированной системы «Эквис Visual Lab» (ООО «Практика-НЦ», Москва, Россия). Мышей акклиматизировали в течение 2 недель перед экспериментальными процедурами, помещая в стандартные клетки из поликарбоната типа 3 (1820 см²) с подстилкой SAFE BK8/15 («JRS», Германия), свободным доступом к полноценному питанию (Velaz FORTI 1324 Maintenance Diet, «Altromin Spezialfutter GmbH & Co KG», Германия) и фильтрованной водопроводной воде. Клетки для

мышей содержали домики Mouse House™ («Tecniplast», Бугуджате, Италия).

В каждой опытной и контрольной группе содержалось по 7–9 животных для оценки интенсивности острой боли и по 5–7 животных для теста «уксуснокислых корчей» (общее количество животных составило 111). Никаких статистических методов или явного анализа мощности для предварительного определения размера выборки перед экспериментами не проводилось, поскольку не было предварительных данных для оценки эффективности пептидов на мышах. Полученные результаты были значительными, поэтому дополнительные животные не умерщвлялись. При планировании и проведении экспериментов на животных применялся слепой метод формирования групп и проведения всех последующих процедур.

В исследовании не использовались фармацевтические методы облегчения боли и страдания животных, поскольку эксперименты были направлены на контролируемое моделирование болевых синдромов и оценку анальгетической эффективности химических соединений. Однако количество животных, использованных в исследовании, было минимально возможным для получения надёжных результатов.

Оценка интенсивности острой боли. Фосфатно-солевой буфер (PBS; pH 7,4) отдельно или соединения, растворённые в буфере PBS (pH 7,4), а также кислый раствор (буфер PBS, pH 5,5) вводили внутривенно в постоянном объёме 20 мкл. Ноцифентивное поведение определяли как время облизывания лапы в течение 30 мин после инъекции. Пептид Ugr9-1 вводили внутривенно за 30 мин до тестирования.

Тест «уксуснокислые корчи». Мышей разделяли на отдельные группы и за 30 мин до тестирования внутривенно вводили пептиды или физиологический раствор. Внутривенно вводили 0,6%-ный раствор уксусной кислоты в физиологическом растворе (10 мл/кг) и сразу после этого мышей помещали в прозрачные стеклянные цилиндры, где регистрировали количество корчей, возникших в течение 15 мин.

Статистический анализ данных. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения OriginPro 8.6 («OriginLab Corporation», Нортгемптон, США).

Зависимости амплитуды тока через каналы ASIC3 крысы от pH-ответа аппроксимировались уравнением Хилла $F1(x) = ((A1 - A2) / (1 + (x/[H^+]_{50})^{nH})) + A2$; где $[H^+]_{50}$ — концентрация протонов, при которой достигается полумаксимальная амплитуда тока; A1 — минимальное значение тока; A2 — амплитуда

максимального ответа; n_H — коэффициент Хилла. Максимальную амплитуду ($I_{\max}$) рассчитывали на основе значений амплитуд, полученных при каждом pH для каждого ооцита отдельно путём индивидуальной подгонки. Затем данные нормализовали до рассчитанного значения $I_{\max}$. Нормализованные данные были усреднены и подогнаны по логистическому уравнению $F1(x)$.

Перед дисперсионным анализом был проведён тест Шапиро–Уилка для определения нормального распределения данных. Непарный критерий Стьюдента, состоящий из двух средних значений ($M1$ и $M2$) и общей стандартной ошибки (SE) двух выборок ($t = (M1 - M2)/SE$), использовался для определения значимости разницы между средними значениями, полученными в экспериментах *in vitro* (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>). Значимость различий в данных, полученных в результате испытаний на животных, определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным тестом Тьюки.

Уровень значимости: *, \$, & $p < 0,05$; **, \$\$, && $p < 0,01$; ***, \$\$\$, &&& $p < 0,005$; ****, \$\$\$\$, &&&& $p < 0,001$. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дизайн пептидов. Как и другие нейропептиды, rNS, по-видимому, подвергается деградации вследствие важного регуляторного процесса в живом организме (см. отличный обзор Hallberg [22]). В частности, нейропептид ноцицептин/орфанин FQ, синтезируемый как общий предшественник с rNS [23], метаболизируется в различных частях организма мыши, крысы и человека с помощью множества ферментов: аминопептидазы N, эндопептидазы 24.15 и нейтральной эндопептидазы 24.11 [24–26]. Расщепление пролилэндопептидазой по Pro21 могло привести к образованию фрагмента rNS Δ 21 (таблица) [27, 28]. Кроме

того, в качестве конечной точки можно ожидать самый короткий пептид (rNS Δ 30) по аналогии с энкефалином, который также состоит из 5 остатков и катаболизируется той же эндопептидазой 24.11 [29].

Действие NS и продуктов его деградации на каналы ASIC3. Активность как rNS, так и продуктов его протеолиза измеряли методом двух-электродной фиксации потенциала на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих каналы ASIC3 крысы (rASIC3). Для выяснения механизма действия rNS мы исследовали влияние пептида на протонную чувствительность канала. Для этого мы выбрали концентрацию rNS 200 мкМ и протестировали, как изменится зависимость SSD и активации rASIC3. Таким образом, rNS значимо смещал pH, необходимый для полумаксимальной стационарной десенситизации (pH_{50} SSD), в сторону более высокой концентрации протонов (более низкого pH) (с $pH\ 7,13 \pm 0,03$ до $pH\ 7,005 \pm 0,085$; $n = 10-20$; $p < 0,05$, t -критерий) (рис. 1, а, в), а также существенно смещал pH, необходимый для полумаксимальной активации (pH_{50} акт), в сторону более низкого значения (с $pH\ 6,46 \pm 0,16$ до $pH\ 6,26 \pm 0,03$; $n = 13-27$, $p < 0,05$, t -критерий, рис. 1, б, в). Следует отметить, что значение n_H для pH-зависимости SSD уменьшилось в два раза по сравнению с контролем (с $8,2 \pm 1,2$ до $3,97 \pm 2,43$), тогда как значение n_H для pH-зависимости активации каналов достоверно не изменилось (с $2,3 \pm 1,3$ до $2,6 \pm 0,3$).

Для двух других пептидов, rNS Δ 21 и rNS Δ 30, такие же измерения проводили при той же концентрации 200 мкМ. rNS Δ 21 значительно смещал pH_{50} SSD в сторону более низких значений (с $7,13 \pm 0,03$ ($n_H = 8,2 \pm 1,2$) до $7,07 \pm 0,03$ ($n_H = 6,97 \pm 2,43$); $n = 10-20$; $p < 0,05$, t -тест) (рис. 1, з, д), но не смещал значения pH_{50} акт (с $6,46 \pm 0,16$ до $6,44 \pm 0,03$) и n_H (с $2,3 \pm 1,3$ до $2,3 \pm 0,3$, $n = 15-27$) (рис. 1, д). rNS Δ 30 незначительно смещал pH_{50} SSD в сторону более низких концентраций протонов (более высоких значений) (от $7,13 \pm 0,03$ ($n_H = 8,2 \pm 1,2$) до $7,14 \pm 0,03$

Обозначение пептидов и аминокислотная последовательность

Обозначение пептида	Последовательность
rNS	MPRVRSVVQARDAEPEADAEPVADEADEVEQKQLQ
rNS Δ 21 ¹	-----VADEADEVEQKQLQ
rNS Δ 30	-----QKQLQ

¹ Δn обозначает количество укороченных аминокислот.

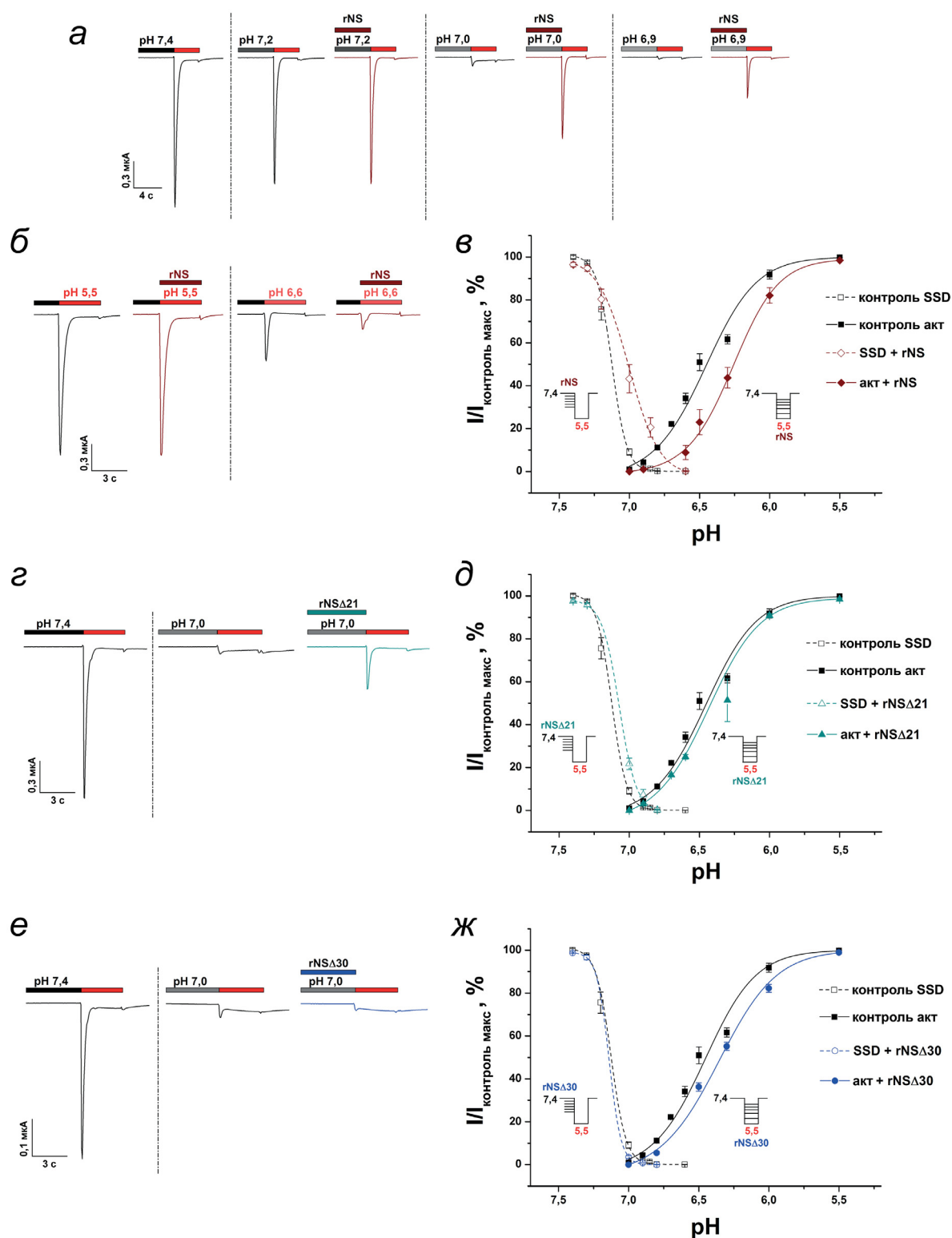


Рис. 1. Влияние rNS и его укороченных аналогов на pH-зависимость активации и стационарной десенситизации ASIC3-канала. *а* – Репрезентативные профили тока, полученные из одного и того же ооцита при активации стимулом с pH 5,5 после предварительной инкубации при различных кондиционирующих pH либо без, либо в присутствии 200 мкМ rNS. *б* – Репрезентативные профили тока, полученные при активации различными стимулами pH либо без, либо в присутствии 200 мкМ rNS (кондиционирующий pH 7,4). *в* – Зависимости стационарной десенситизации (штриховая линия) и активации (сплошная линия) от pH для rASIC3 как без, так и в присутствии 200 мкМ rNS ($n = 10-27$). *г, е* – Репрезентативные профили тока, полученные из одного и того же ооцита при активации стимулом с pH 5,5 после предварительной инкубации с кондиционирующим pH 7,0 либо без, либо в присутствии 200 мкМ rNS Δ 21 (*г*), 200 мкМ rNS Δ 30 (*е*). *д* и *ж* – pH-зависимости стационарной десенситизации (штриховая линия) и активации (сплошная линия) для rASIC3 как без, так и в присутствии 200 мкМ rNS Δ 21 (*д*), 200 мкМ rNS Δ 30 (*ж*) ($n = 10-27$)

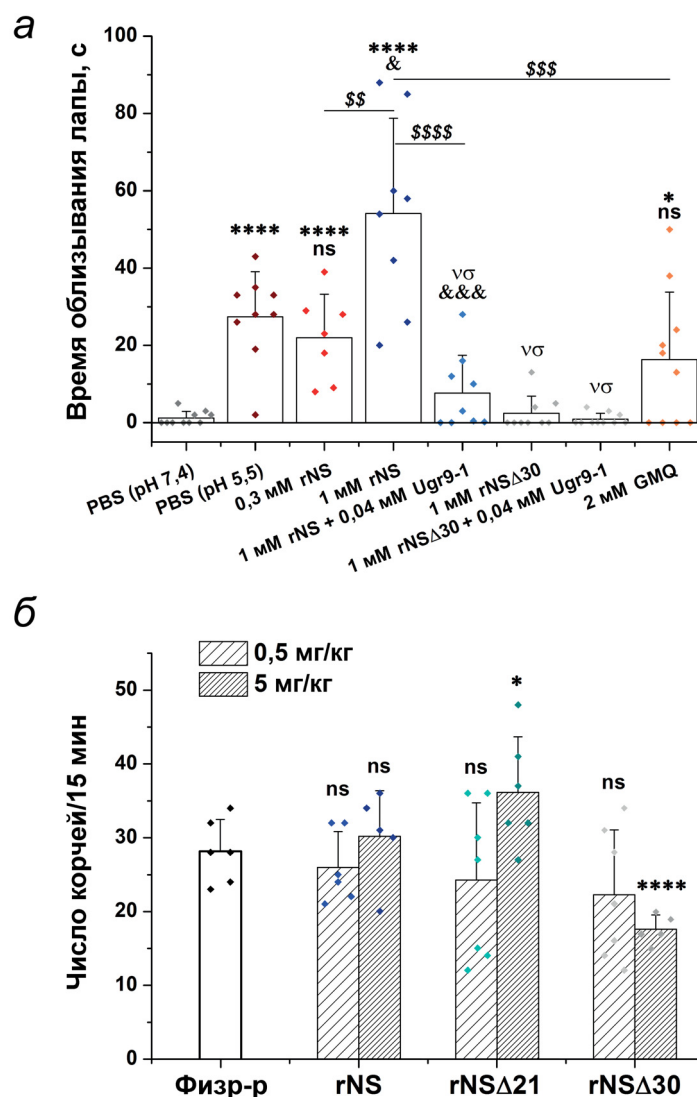


Рис. 2. Поведение, связанное с болью, и анальгетические эффекты, вызванные rNS и продуктами его деградации. *а* – Поведение, связанное с болью, измеренное по времени, затраченному на облизывание лапы после инъекции PBS, пептидов или GMQ (20 мкл). Данные представлены как средние значения $\pm$ SD ($n = 7-10$). * $p < 0,05$, **** $p < 0,001$, vs, незначительно по сравнению с группой PBS (pH 7,4); & $p < 0,05$, &&& $p < 0,005$, ns, незначительно по сравнению с группой PBS (pH 5,5); \$\$\$ $p < 0,01$, \$\$\$\$ $p < 0,005$, \$\$\$\$ $p < 0,001$ по сравнению с группой 1 mM rNS. *б* – Влияние rNS, rNSΔ21 и rNSΔ30 на корчи, вызванные уксусной кислотой. Внутривенное введение пептидов мышам (за 30 мин до тестирования) усиливало (как в случае с rNSΔ21) или, наоборот, ослабляло (как в случае rNSΔ30) ответ на внутрибрюшинное введение уксусной кислоты, что оценивалось по количеству корчей в интервале 15 мин. Данные представляют собой средние значения $\pm$ SD ($n = 5-7$). * $p < 0,05$, **** $p < 0,001$, ns, незначительно по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор

($n_H = 9,98 \pm 2,5$); $n = 10-20$) (рис. 1, *е*, *ж*) и значимо смещал pH_{50} акт в сторону более низких значений (от $6,46 \pm 0,16$ ($n_H = 2,3 \pm 1,3$) до $6,36 \pm 0,12$ ($n_H = 2,1 \pm 0,9$); $n = 16-27$; $p < 0,05$, t -критерий) (рис. 1, *ж*).

Эффект NS и продуктов его протеолиза *in vivo*. Каналы ASIC3 играют важную роль в различных болевых процессах [11, 30, 31], а лиганды, способные активировать эти каналы, вызывают болевой ответ. Действительно, инъекция rNS в заднюю лапу мышей вызывала острое болевое поведение, измеряемое как общее

время лизания животным инъекционной лапы (рис. 2, *а*). Этот эффект был дозозависимым, и rNS (1 mM) был в два раза эффективнее, чем введение контрольного буфера с pH 5,5.

Совместное введение rNS и Ugr9-1 (пептида, селективно ингибирующего активность каналов ASIC3 и обладающего анальгезирующими свойствами) приводило к практически полному подавлению болевого ответа (рис. 2, *а*). Таким образом, болевое поведение, связанное с инъекцией rNS, скорее всего, было опосредовано каналами ASIC3.

В другом болевом тесте оценивали влияние rNS и его фрагментов на интенсивность висцеральной боли, вызванной внутрибрюшинным введением раствора уксусной кислоты, которое измеряли по количеству непроизвольных сокращений живота за 15 мин. rNS не оказывал существенного влияния на поведение, связанное с болью, тогда как rNSΔ21 и rNSΔ30 значительно увеличивали и уменьшали интенсивность болевой реакции соответственно (рис. 2, б). rNSΔ21 увеличивал количество корчей на 28% по отношению к контрольной группе и на 20% по отношению к группе, получавшей rNS. rNSΔ30, напротив, оказывал анальгетический эффект в этом тесте, уменьшая количество корчей на 37,5% относительно группы физраствора и на 42% относительно группы rNS, что хорошо согласовывалось с его чистым ингибирующим действием на канал ASIC3 *in vitro* (рис. 1, ж).

ОБСУЖДЕНИЕ

Крысиный NS представляет собой нейропептид длиной 35 аминокислот, который вырабатывается в клетках вместе с ноцицептином (NC) из одного белка-предшественника. NC подвергается весьма разнообразному процессу ферментативной деградации, что должно указывать на тот же путь деградации, что и в случае rNS. Здесь мы протестировали только 3 фрагмента, представляющие rNS, усечённые с N-конца разным количеством аминокислот. Данные *in vitro* показали, что rNS одновременно проявляет способность как положительно, так и отрицательно модулировать ASIC3. Выступая в роли положительного модулятора, rNS достоверно (на 0,12 ед.) смещал значение pH_{50} SSD в более кислую область (рис. 1, в), а это означает, что для десенситизации каналу необходима существенно более высокая концентрация протонов. Наиболее отчётливо этот эффект можно наблюдать при кондиционировании pH 7,0: в контроле амплитуда ответа канала на кислотный стимул (pH 5,5) составила $9,1 \pm 5,7\%$ от максимального ответа при физиологическом кондиционировании pH 7,4–7,3, тогда как при предварительной инкубации с rNS при pH 7,0 амплитуда увеличивалась до $43,3 \pm 14,7\%$ от максимума (рис. 1, а; рис. 3).

Отрицательная модуляция rNS была показана на pH-зависимости активации ASIC3, где rNS также достоверно (на 0,25 ед.) смещал значение pH_{50} акт в более кислую область (рис. 1, в). На сегодняшний день rNS является первым эндогенным нейропептидом позво-

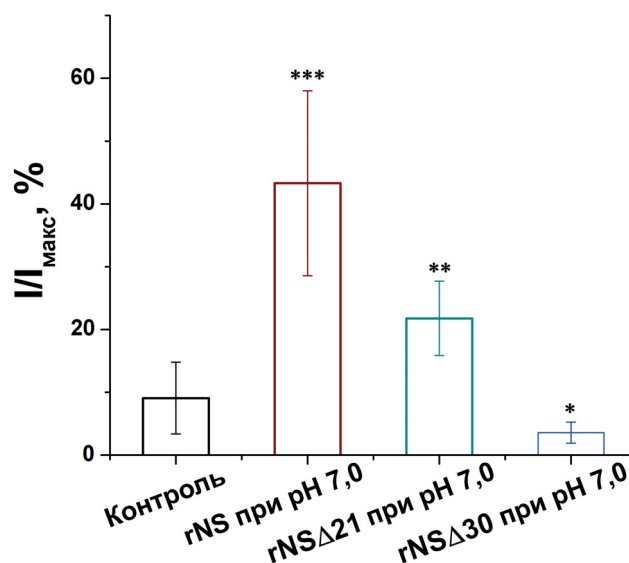


Рис. 3. rNS и rNSΔ21, но не rNSΔ30, препятствуют стационарной десенситизации канала. Усреднённые данные токов ($I/I_{\max}$) получали при использовании pH 5,5 на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих rASIC3, после предварительной инкубации при pH 7,0 с 200 мкМ указанного пептида или без него; значения приводили в % от токов, полученных при использовании pH 5,5 после предварительной инкубации при pH 7,4. Звёздочки указывают на значительную разницу с контролем (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$). Данные представлены как среднее $\pm$ SD; $n = 5-15$

ночных, оказывающим такое влияние на изоформы ASIC3 [32]. Другой эндогенный нейропептид — динорфин — оказывает аналогичный эффект в концентрациях, сравнимых с таковыми для rNS, но его действие ограничено изоформой ASIC1a [33, 34].

Интересно, что rNSΔ21 проявлял только положительные модуляторные свойства на ASIC3, что выражалось в значимом сдвиге (на 0,05 ед.) значения pH_{50} SSD в более кислую область (рис. 1, д), и, как следствие, амплитуда ответа канала на кислый стимул при pH 7,0 составляла $21,8 \pm 5,9\%$ от максимального значения (рис. 1, г; рис. 3). Таким образом, положительная модулирующая активность rNSΔ21 была в 2 раза ниже, чем у полноразмерного rNS. Самый короткий пептид, rNSΔ30, проявлял лишь отрицательные модуляторные свойства, существенно (на 0,15 ед.) смещая значение pH_{50} акт в более кислую область (рис. 1, ж) и незначительно усиливая десенситизирующий эффект при кондиционировании pH 7,0, что приводило к снижению ответа до $3,6 \pm 1,7\%$ от максимума (рис. 1, е; рис. 3).

Для пептида rNS впервые продемонстрирована способность индуцировать болевое поведение в тесте острой боли на мышах (рис. 2, а). Как показали Kuspiel et al. [35] (это также коррелирует с нашими данными),

гNS в концентрации 0,3 мМ способен подкислять среду до pH 6,6–6,7. Однако известно, что введение раствора с таким значением pH не вызывает выраженного острого болевого эффекта. В то же время 0,3 мМ гNS оказывал болевой эффект, сравнимый по силе с действием буфера с pH 5,5, что подтверждало влияние активности гNS на болевое поведение. Более того, эффект от применения 0,3 мМ гNS был сравним по силе с эффектом от 2 мМ GMQ, который, как было показано, индуцирует связанное с болью поведение посредством активации ASIC3 [14]. Дополнительным доказательством вклада ASIC3 в генерацию боли в этой модели стало снижение уровня боли в группе, получавшей гNS вместе с пептидом Ugr9-1, который является антагонистом ASIC3.

Интересно, что в тесте абдоминальных корчей, индуцированных уксусной кислотой, при системном введении вещества для гNS не наблюдалось ни проноцицептивного, ни анальгетического эффекта, тогда как укороченные аналоги гNSΔ21 и гNSΔ30 демонстрировали проноцицептивный и анальгезирующий эффекты соответственно (рис. 2, б). Этот результат можно объяснить двунаправленной активностью гNS на ASIC3 в качестве как положительного, так и отрицательного модулятора, тогда как гNSΔ21 и гNSΔ30 проявляли свойства только положительного и отрицательного модуляторов соответственно.

Таким образом, продукты деградации гNS представляют собой наглядный пример взаимосвязи структура-активность, и мы можем видеть, как фармакологические свойства регуляторной молекулы постепенно транс-

формируются после протеолиза от вызывающих/усиливающих боль к анальгетическим. Более того, гNSΔ30 можно рассматривать как молекулу-кандидата для разработки анальгезирующего препарата. Дальнейшие работы по оптимизации этого пептида должны продемонстрировать перспективы его развития в качестве инновационного препарата.

Вклад авторов. С.А.К., Д.И.А., Я.А.А. — инициировали и руководили исследованием; Д.И.О., Н.В.Т., А.А.Н., В.А.П., Я.А.П. — проводили эксперименты; Д.И.О., И.А.Д., Я.А.А., С.А.К. — обсудили результаты экспериментов с участием всех авторов; Д.И.О., С.А.К. — написали текст; А.А.Н., Я.А.А. — редактировали текст статьи.

Благодарности. Мы благодарны Сильви Диошо (Институт фармакологии молекулярной и клеточной медицины, Вальбонн, Франция) за плазмиду PCi, содержащую кДНК крысиного ASIC3.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-75-10021 (<https://rscf.ru/project/22-75-10021/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утверждённым правовым актам РФ и международных организаций. Эта статья не содержит каких-либо исследований с участием людей, выполненных кем-либо из авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chu, X.-P., and Xiong, Z.-G. (2012) Physiological and pathological functions of acid-sensing ion channels in the central nervous system, *Curr. Drug Targets*, **13**, 263-271, doi: 10.2174/138945012799201685.
2. Carattino, M. D., and Montalbetti, N. (2020) Acid-sensing ion channels in sensory signalling, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **318**, F531-F543, doi: 10.1152/ajprenal.00546.2019.
3. Wemmie, J. A., Price, M. P., and Welsh, M. J. (2006) Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities, *Trends Neurosci.*, **29**, 578-586, doi: 10.1016/j.tins.2006.06.014.
4. Deval, E., and Lingueglia, E. (2015) Acid-sensing ion channels and nociception in the peripheral and central nervous systems, *Neuropharmacology*, **94**, 49-57, doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.02.009.
5. Schuhmacher, L.-N., and Smith, E. S. J. (2016) Expression of acid-sensing ion channels and selection of reference genes in mouse and naked mole rat, *Mol. Brain*, **9**, 97, doi: 10.1186/s13041-016-0279-2.
6. Boscardin, E., Alijevic, O., Hummler, E., Frateschi, S., and Kellenberger, S. (2016) The function and regulation of acid-sensing ion channels (ASICs) and the epithelial Na⁺ channel (ENaC): IUPHAR review 19, *Br. J. Pharmacol.*, **173**, 2671-2701, doi: 10.1111/bph.13533.
7. Osmakov, D. I., Khasanov, T. A., Andreev, Y. A., Lyukmanova, E. N., and Kozlov, S. A. (2020) Animal, herb, and microbial toxins for structural and pharmacological study of acid-sensing ion channels, *Front. Pharmacol.*, **11**, 991, doi: 10.3389/fphar.2020.00991.

8. Salinas, M., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2009) Structural elements for the generation of sustained currents by the acid pain sensor ASIC3, *J. Biol. Chem.*, **284**, 31851-31859, doi: 10.1074/jbc.M109.043984.
9. Deval, E., Noël, J., Lay, N., Alloui, A., Diochot, S., et al. (2008) ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain, *EMBO J.*, **27**, 3047-3055, doi: 10.1038/emboj.2008.213.
10. Yagi, J., Wenk, H. N., Naves, L. A., and McCleskey, E. W. (2006) Sustained currents through ASIC3 ion channels at the modest pH changes that occur during myocardial ischemia, *Circ. Res.*, **99**, 501-519, doi: 10.1161/01.RES.0000238388.79295.4c.
11. Dulai, J. S., Smith, E. S. J., and Rahman, T. (2021) Acid-sensing ion channel 3: an analgesic target, *Channels*, **15**, 94-127, doi: 10.1080/19336950.2020.1852831.
12. Gründer, S., and Pusch, M. (2015) Biophysical properties of acid-sensing ion channels (ASICs), *Neuropharmacology*, **94**, 9-18, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.016.
13. Bohlen, C. J., Chesler, A. T., Sharif-Naeini, R., Medzihradsky, K. F., Zhou, S., et al. (2011) A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain, *Nature*, **479**, 410-414, doi: 10.1038/nature10607.
14. Yu, Y., Chen, Z., Li, W.-G., Cao, H., Feng, E.-G., et al. (2010) A nonproton ligand sensor in the acid-sensing ion channel, *Neuron*, **68**, 61-72, doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.001.
15. Osmakov, D. I., Koshelev, S. G., Andreev, Y. A., Dubinnyi, M. A., Kublitski, V. S., et al. (2018) Proton-independent activation of acid-sensing ion channel 3 by an alkaloid, lindoldhamine, from *Laurus nobilis*, *Br. J. Pharmacol.*, **175**, 924-937, doi: 10.1111/bph.14134.
16. Alijevic, O., and Kellenberger, S. (2012) Subtype-specific modulation of acid-sensing ion channel (ASIC) function by 2-guanidine-4-methylquinazoline, *J. Biol. Chem.*, **287**, 36059-36070, doi: 10.1074/jbc.M112.360487.
17. Marra, S., Ferru-Clément, R., Breuil, V., Delaunay, A., Christin, M., et al. (2016) Non-acidic activation of pain-related acid-sensing ion channel 3 by lipids, *EMBO J.*, **35**, 414-428, doi: 10.15252/embj.201592335.
18. Osmakov, D. I., Koshelev, S. G., Andreev, Y. A., and Kozlov, S. A. (2017) Endogenous isoquinoline alkaloids agonists of acid-sensing ion channel type 3, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 282, doi: 10.3389/FNMOL.2017.00282.
19. Osmakov, D. I., Koshelev, S. G., Ivanov, I. A., Andreev, Y. A., and Kozlov, S. A. (2019) Endogenous neuropeptide nocistatin is a direct agonist of acid-sensing ion channels (ASIC1, ASIC2 and ASIC3), *Biomolecules*, **9**, 401, doi: 10.3390/BIOM9090401.
20. Hallberg, M., and Nyberg, F. (2003) Neuropeptide conversion to bioactive fragments – an important pathway in neuromodulation, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **4**, 31-44, doi: 10.2174/1389203033380313.
21. Osmakov, D. I., Koshelev, S. G., Andreev, Y. A., Dyachenko, I. A., Bondarenko, D. A., et al. (2016) Converted mutagenesis of an inactive peptide to ASIC3 inhibitor for active sites determination, *Toxicon*, **116**, 11-16, doi: 10.1016/j.toxicon.2015.11.019.
22. Hallberg, M. (2015) Neuropeptides: metabolism to bioactive fragments and the pharmacology of their receptors, *Med. Res. Rev.*, **35**, 464-519, doi: 10.1002/med.21323.
23. Okuda-Ashitaka, E., and Ito, S. (2014) Nocistatin: milestone of one decade of research, *Curr. Pharmaceut. Design*, **21**, 868-884, doi: 10.2174/1381612820666141027112451.
24. Sakurada, C., Sakurada, S., Orito, T., Tan-No, K., and Sakurada, T. (2002) Degradation of nociceptin (orphanin FQ) by mouse spinal cord synaptic membranes is triggered by endopeptidase-24.11: an *in vitro* and *in vivo* study, *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 1293-1303, doi: 10.1016/S0006-2952(02)01295-9.
25. Terenius, L., Sandin, J., and Sakurada, T. (2000) Nociceptin/orphanin FQ metabolism and bioactive metabolites, *Peptides*, **21**, 919-922, doi: 10.1016/S0196-9781(00)00228-X.
26. Montiel, J. L., Cornille, F., Roques, B. P., and Noble, F. (1997) Nociceptin/orphanin FQ metabolism: role of aminopeptidase and endopeptidase 24.15, *J. Neurochem.*, **68**, 354-361, doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.68010354.x.
27. Mentlein, R., and Struckhoff, G. (1989) Purification of two dipeptidyl aminopeptidases II from rat brain and their action on proline-containing neuropeptides, *J. Neurochem.*, **52**, 1284-1293, doi: 10.1111/j.1471-4159.1989.tb01877.x.
28. Kozlov, S. A., and Grishin, E. V. (2007) The universal algorithm of maturation for secretory and excretory protein precursors, *Toxicon*, **49**, 721-726, doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.007.
29. Erdős, E. G., and Skidgel, R. A. (1989) Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones, *FASEB J.*, **3**, 145-151, doi: 10.1096/fasebj.3.2.2521610.
30. Wu, J., Liu, T. T., Zhou, Y. M., Qiu, C. Y., Ren, P., et al. (2017) Sensitization of ASIC3 by proteinase-activated receptor 2 signaling contributes to acidosis-induced nociception, *J. Neuroinflammation*, **14**, 150, doi: 10.1186/s12974-017-0916-4.
31. Deval, E., Gasull, X., Noël, J., Salinas, M., Baron, A., et al. (2010) Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain, *Pharmacol. Ther.*, **128**, 549-558, doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.08.006.
32. Gründer, S., Ramírez, A. O., and Jékely, G. (2023) Neuropeptides and degenerin/epithelial Na⁺ channels: a relationship from mammals to cnidarians, *J. Physiol.*, **601**, 1583-1595, doi: 10.1113/JP282309.

33. Vick, J. S., and Askwith, C. C. (2015) ASICs and neuropeptides, *Neuropharmacology*, **94**, 36-41, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.012.
34. Borg, C. B., Braun, N., Heusser, S. A., Bay, Y., Weis, D., et al. (2020) Mechanism and site of action of big dynorphin on ASIC1a (supplementary), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 7447-7454, doi: 10.1073/pnas.1919323117.
35. Kuspiel, S., Wiemuth, D., and Gründer, S. (2021) The neuropeptide nocistatin is not a direct agonist of acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a), *Biomolecules*, **11**, 571, doi: 10.3390/biom11040571.

NOCISTATIN AND PRODUCTS OF ITS PROTEOLYSIS AS DUAL MODULATORS OF TYPE 3 ACID-SENSING ION CHANNELS (ASIC3) WITH AN ALGESIC AND ANALGESIC EFFECT

**D. I. Osmakov^{1,2*}, N. V. Tarasova², A. A. Nedorubov³, V. A. Palikov⁴, Y. A. Palikova⁴,
I. A. Dyachenko⁴, Y. A. Andreev^{1,2}, and S. A. Kozlov^{1*}**

¹ Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
117997 Moscow, Russia; e-mail: osmadim@gmail.com; serg@ibch.ru

² Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia

³ Institute of Translational Medicine and Biotechnology, Sechenov First Moscow State Medical University,
119991 Moscow, Russia

⁴ Branch of the Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Russia

The neuropeptide nocistatin (NS) is expressed by cells of the nervous system and neutrophils as part of a precursor protein and can undergo limited proteolysis through stepwise degradation. Previously, it was shown that rat NS (rNS) is able to activate acid-sensing ion channels (ASIC), but this effect correlated with the acidic nature of NS. In this work, we investigated the change in the properties of rNS during its degradation by a comparison of rNS and its two synthesized fragments. We estimated their activity on rat ASIC3 channels expressed in *X. laevis* oocytes, and the effects in pain tests on mice. We have shown that rNS combines the properties of both positive and negative modulators of ASIC3, which is expressed in the ability to lower the channel's steady-state desensitization in the pH range 6.8-7.0 and the reduction of the channel's response to stimuli in the 6.0-6.9 pH range. A shortened analogue (rNSΔ21) (21 amino acid residues (aa) from the N-terminus) retained the effect of the ASIC3 positive modulator only, while the C-terminal pentapeptide (rNSΔ30) retained the ability of the ASIC3 negative modulator only. This tendency was confirmed in animal tests, where rNS and rNSΔ21 induced pain related behavior, but rNSΔ30 showed an analgesic effect. Thus, we have shown the change of the rNS action mode during stepwise degradation, from an algesic molecule through a pain-enhancer to a pain-relief wherefore the final pentapeptide can even be considered as a promising starting point for further drug development.

Keywords: neuropeptide, nocistatin, ASIC channels, electrophysiology, pain, analgesia