

УДК 577.1+577.2+577.3.

ПЕПТИДНЫЙ БЛОКАТОР ИОННОГО КАНАЛА TRPV1 ПРОЯВЛЯЕТ ДЛИТЕЛЬНЫЙ АНАЛЬГЕТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ В МОДЕЛИ ТЕПЛОВОЙ СТИМУЛЯЦИИ

© 2020 г. О. В. Синцова¹, В. А. Паликов², Ю. А. Паликова², А. А. Климович¹,
И. Н. Гладких¹, Я. А. Андреев^{3,4}, М. М. Монастырская¹, Э. П. Козловская¹,
И. А. Дьяченко², С. А. Козлов³, Е. В. Лейченко^{1,*}

Представлено академиком РАН В. А. Стоником

Поступило 26.12.2019 г.

После доработки 20.02.2020 г.

Принято к публикации 06.03.2020 г.

Одним из важнейших интеграторов болевых и воспалительных стимулов является ионный канал TRPV1, который рассматривается как перспективная терапевтическая мишень в лечении болевых состояний. В настоящей работе проведено сравнительное изучение анальгетического действия в тесте “горячая пластина” рекомбинантных аналогов пептидов Кунитц-типа из яда морской анемоны *Heteractis crispa*: APHC1 – модулятора TRPV1, и HCRG21 – полного блокатора TRPV1. В результате проведенных биологических испытаний показано, что полный блокатор HCRG21, несмотря на более высокое значение 50% эффективной концентрации ингибирования TRPV1, обладал равной анальгетической способностью с APHC1 при внутримышечном введении и сохранял ее в течение 13 часов наблюдения. Анальгетический эффект APHC1 в дозе 0.1 мг/кг при внутримышечном введении развивался очень быстро, за 5 мин, но длился менее 3 ч. Различия в фармакодинамическом профиле пептидов хорошо согласуются с различными механизмами их связывания с TRPV1.

Ключевые слова: морская анемона, *Heteractis crispa*, TRPV1, ноцицепция, анальгезия

DOI: 10.31857/S268673892003018X

В настоящее время ионные каналы являются перспективными терапевтическими мишенями для создания селективных лекарственных препаратов нового поколения. Выяснение механизмов их функционирования в норме и при патологии остается одной из актуальных задач биохимии, решение которой невозможно без использования соединений различной химической природы, способных специфически взаимодействовать с этими белками, и по возможности проявлять от-

личающиеся эффекты. Целенаправленный поиск новых лигандов ионных каналов как кандидатов для создания лекарственных препаратов представляет постоянный научный интерес, как для разработки методологии фундаментальных и прикладных исследований, так и для селекции наиболее безопасного и эффективного лекарственного средства.

Канал TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1) является одним из важнейших интеграторов болевых и воспалительных стимулов и рассматривается как терапевтическая мишень в лечении болевых состояний разной этиологии. В организме млекопитающих он отвечает, прежде всего, за терморегуляцию и передачу болевых сигналов от периферии в мозг, и, как молекулярный сенсор, он распознает опасное нагревание выше 43°C, закисление внеклеточной среды и многочисленные агонисты различной природы [1].

Традиционные анальгетические средства по основному механизму своего действия либо подавляют воспалительные процессы, либо тормозят функционирование болевой (ноцицептивной) системы. Антагонисты TRPV1, блокируя важный рецептор и интегратор болевых стимулов

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

² Филиал Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Пущино, Московская область, Россия

³ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава России, Институт Молекулярной медицины, Москва, Россия

*e-mail: leychenko@gmail.com

	1	10	20	30	40	58	%
HCRG21	-RGICSEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSETGKCTPFIYGGCEGNGN	FFETLRACRAICRA-				100
APHC1	-GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSETGKCTVFIYGGCEGNGN	FFETLRACRAICRA-				93
APHC2	-GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSETGKCTPFIYGGCEGNGN	FFETLRACRAICRA-				95
APHC3	-GSICLEPKVVGPC	TAYFRFYFNSETGKCTPFIYGGCEGNGN	FFETLRACRGICRA-				89
BPTI	RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYN	AKASLQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTGGGA					36

Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей пептидов Кунитц-типа морской анемоны *H. crispa*, модуляторов TRPV1, и BPTI из *Bos taurus*. Выравнивание выполнено с помощью программы Vector NTI. Консервативные и подобные аминокислотные остатки (а.о.) выделены светлым оттенком серого цвета. Идентичные а.о. показаны на темно-сером фоне. Справа от последовательностей указан процент их идентичности относительно HCRG21.

на чувствительных нейронах, вызывают длительную анальгезию, поэтому их следует рассматривать как реальную альтернативу традиционным анальгезирующим средствам. К настоящему времени из природных источников выделено довольно много низкомолекулярных соединений и несколько пептидных лигандов к TRPV1, однако все они являются либо активаторами (капсаицин, резинифератоксин, VaTx1-3, DkTx, RhTx, VmP01), либо неполными ингибиторами (APHC1–APHC3, AG489) этого канала [2].

Ранее нами было установлено, что рекомбинантный аналог пептида HCRG21, ген которого был найден среди транскриптов, кодирующих пептиды Кунитц-типа морской анемоны *Heteractis crispa*, ингибирует сериновые протеазы: трипсин (константа ингибирования, K_i , 2.0×10^{-7} М) и химотрипсин (K_i , 7.0×10^{-7} М) и блокирует на 95% индуцированные капсаицином токи, проходящие через экспрессированные в ооцитах лягушки каналы TRPV1 (IC_{50} 6.9 ± 0.4 мкМ) [3]. Этот пептид обладает высокой структурной гомологией (до 95% идентичности) с выделенными из той же морской анемоны модуляторами TRPV1 – пептидами APHC1–APHC3 (рис. 1), которые проявляют анальгетический эффект в различных моделях стимуляции боли у лабораторных животных [4–9]. Пептиды APHC1–APHC3 и HCRG21 имеют характерную $\alpha + \beta$ укладку, стабилизированную тремя дисульфидными связями, так называемый BPTI/Кунитц-тип, впервые описанный для ингибитора сериновых протеаз из поджелудочной железы быка (BPTI – Bovine Pancreas Trypsin Inhibitor).

Согласно данным молекулярного моделирования, пептиды APHC1 и HCRG21 имеют разные сайты связывания: APHC1 взаимодействует с TRPV1 в области внешней P-петли [10], тогда как HCRG21 блокирует трансмембранную пору канала [3]. Блокирование поры и, как следствие, снижение проводимости ионного канала по другому механизму – является принципиально иным методическим подходом для купирования боли,

несмотря на взаимодействие HCRG21 с той же молекулярной мишенью, что и APHC1.

Для изучения анальгетического эффекта мы получили рекомбинантные аналоги пептидов APHC1 и HCRG21 согласно разработанным ранее методикам [3, 11–14]. Для клонирования генов, кодирующих эти пептиды, использовали плазмиду pET32b. Пептиды получали в составе гибридного белка с тиоредоксином и полигистидиновой последовательностью для выделения целевых продуктов с помощью металл-аффинной хроматографии. Перед первым аминокислотным остатком пептидов был размещен остаток метионина для селективного расщепления гибридного белка и получения целевого продукта [15]. Обработанные бромцианом пептиды были очищены методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Выход целевых пептидов составил 2.0 и 5.5 мг/л культуральной среды для APHC1 и HCRG21 соответственно. Молекулярные массы полученных пептидов, по данным MALDI-TOF MS, соответствовали расчетным.

Эффективность обоих лигандов при внутримышечном способе введения была впервые оценена на животной модели “горячая пластина”, которая наиболее объективно отражает активацию канала TRPV1 теплом. Рекомбинантные пептиды в дозах от 0.01 до 1 мг/кг в объеме 0.07 мл вводили мышам линии ICR в латеральную мышцу левого бедра. Контрольным мышам вводили 1%-ный раствор PBS в том же объеме. После введения исследуемых веществ на 60-й мин животных помещали на горячую пластину Hot-Plate Analgesia Meter (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA), заранее нагретую до 55°C. Фиксировали латентное время от момента помещения животного на горячую пластину до первого подпрыгивания. Максимальное время пребывания животного на пластине составляло 60 с.

Согласно полученным данным, анальгетическое действие пептидов в дозе 0.1 мг/кг одинаково достоверно отличалось от контроля, но время задержки времени первого подпрыгивания для модулятора APHC1 было больше. Таких же зна-

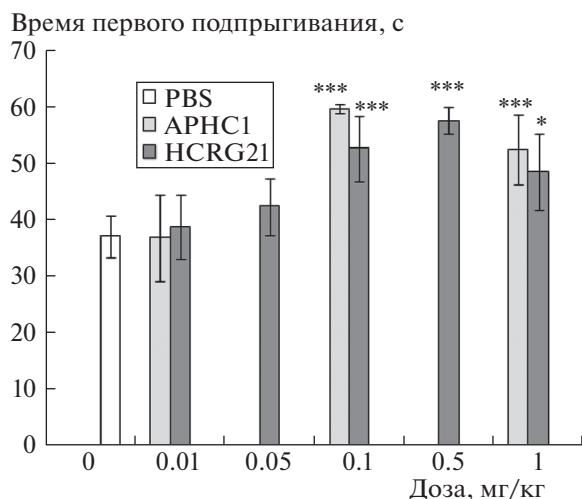


Рис. 2. Дозозависимое ингибирование термической ноцицепции пептидами APHC1 и HCRG21 ($n = 6$ для каждой группы). Результаты представлены в виде среднего значения \pm s.e.; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ по сравнению с группой с PBS (тест Стьюдента).

чений задержки для пептидного блокатора HCRG21 удалось добиться в дозе 0.5 мг/кг (рис. 2). При повышении дозы до 1 мг/кг наблюдалось незначительное снижение эффективности обоих пептидов.

Для сравнения эффективности анальгетического действия была изучена фармакодинамика исследуемых пептидов в том же тесте при внутримышечном введении в течение 24 ч в дозе 0.1 мг/кг.

Ярко-выраженное анальгетическое действие HCRG21 начало проявляться через час после введения и сохранялось в течение 13 ч (рис. 3). В отличие от HCRG21, пептид APHC1 быстро увеличивал время первого подпрыгивания (на 34% уже на 5-й мин), но уже к 3-м ч APHC1 не оказывал достоверного анальгетического эффекта. Это можно объяснить различием измеренных в экспериментах *in vitro* значений полумаксимального эффекта пептидов на проводимость капсаицин-индуцированных токов через TRPV1; так EC_{50} для APHC1 составляло 54 нМ [12], а IC_{50} для HCRG21 – 6.9 мкМ [3]. Более аффинный лиганд APHC1, связываясь прочнее, достигал более быстрого эффекта (максимальный эффект на 15-й мин), тогда как анальгетическое действие полного блокатора HCRG21 развивалось в течение 1 ч (максимальный эффект 2 часа), но оно было более пролонгированным. К 24-м ч эффекты обоих пептидов практически не отличались от контроля.

Таким образом, в настоящем исследовании впервые была изучена анальгетическая активность пептида HCRG21 на животных в тесте тепловой чувствительности “горячая пластина”.

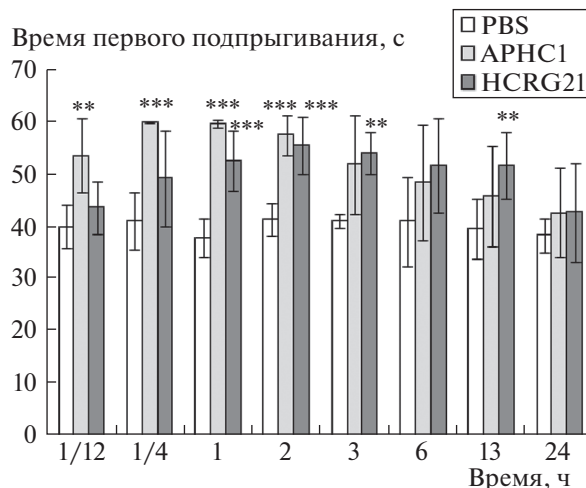


Рис. 3. Динамика развития обезболивающего действия пептидов APHC1 и HCRG21 за 24 ч ($n = 6$ для каждой группы). Результаты представлены в виде среднего значения \pm s.e.; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ по сравнению с группой с PBS (тест Стьюдента).

Данные для APHC1 в подобных тестах были уже опубликованы, но не для внутримышечного способа введения. Результаты исследования объективно отражают потенциал обоих пептидов как хороших анальгетиков. С учетом разности измеренных ранее констант в экспериментах *in vitro*, результаты на животной модели частично подтверждают предположение, сделанное на основе результатов электрофизиологических измерений, что при практически полном блокировании ионного канала TRPV1 можно достичь более длительного анальгетического эффекта. В свою очередь более низкое значение EC_{50} обуславливает быстрое развитие анальгетического эффекта. В итоге оба пептида удачно дополняют друг друга, и их комбинация в одном анальгетическом препарате, вероятно, приведет к очень быстрой и продолжительной анальгезии.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках проекта по гранту РФФ № 19-74-20088, авторы в работе использовали оборудование ЦКП ИБХ, поддержанного Минобрнауки России, идентификатор соглашения RFMEFI62117X0018.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carnevale V., Rohacs T. // *Pharmaceuticals*. 2016. V. 9. P. 1–20.
2. Maatuf Y., Geron M., Priel A. // *Toxins*. 2019. V. 11. P. 1–34.
3. Monastyrnaya M., Peigneur S., Zelepuga E. et al. // *Mar. Drugs*. 2016. V. 14. P. 1–20.

4. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Korolkova Y.V. et al. // *Mar. Drugs*. 2013. V. 11. P. 5100–5115.
5. Козлов С.А., Андреев Я.А., Мурашев А.Н. и др. // *Биоорганическая химия*. 2009. Т. 35. P. 789–798.
6. Дьяченко И.А., Андреев Я.А., Логашина Я.А. и др. // *Докл. АН*. 2015. Т. 465. С. 252–254.
7. Дьяченко И.А., Паликов В.А., Паликова Ю.А., и др. // *Биоорганическая химия*. 2017. Т. 43. С. 482–490.
8. Табакмахер В.М., Синцова О.В., Кривошапко О.Н. и др. // *Докл. АН*. 2015. Т. 461. С. 232–235.
9. Андреев Я.А., Козлов С.А., Козловская Э.П. и др. // *Докл. АН*. 2009. Т. 424. С. 688–691.
10. Nikolaev M.V., Dorofeeva N.A., Komarova M.S. et al. // *PLoS ONE*. 2017. V. 12. P. 1–16.
11. Синцова О.В., Пислягин Е.А., Гладких И.Н. и др. // *Биоорганическая химия*. 2017. Т. 43. С. 105–112.
12. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Koshelev S.G. et al. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 23914–23921.
13. Кветкина А.Н., Лейченко Е.В., Юрченко Е.А. и др. // *Биоорганическая химия*. 2018. Т. 44. С. 408–416.
14. Синцова О.В., Монастырская М.М., Пислягин Е.А. и др. // *Биоорганическая химия*. 2015. Т. 41. С. 657–663.
15. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Vassilevski A.A. et al. // *Anal. Biochem.* 2010. V. 407. P. 144–146.

PEPTIDE BLOCKER OF ION CHANNEL TRPV1 EXHIBITS A LONG ANALGESIC EFFECT IN THE HEAT STIMULATION MODEL

**O. V. Sintsova^a, V. A. Palikov^b, Y. A. Palikova^b, A. A. Klimovich^a, I. N. Gladkikh^a, Y. A. Andreev^{c,d},
M. M. Monastyrnaya^a, E. P. Kozlovskaya^a, I. A. Dyachenko^b, S. A. Kozlov^c, and E. V. Leychenko^{a,#}**

^a G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

^b Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, Russian Federation

^c Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^d Sechenov First Moscow State Medical University, Institute of Molecular Medicine, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: leychenko@gmail.com

Presented by Academician of the RAS V. A. Stonik

The ion channel TRPV1, which is one of the most important integrators of pain and inflammatory stimuli, is considered as a promising therapeutic target in the treatment of pain conditions. In this work, we performed a comparative study of the analgesic effect in the “hot plate” test of recombinant analogues of Kunitz-type peptides from the sea anemone *Heteractis crispa* venom: APHC1 – modulator of TRPV1, and HCRG21 – a full blocker of TRPV1. As a result of biological tests, it was shown that the full blocker HCRG21, despite a higher value of 50% effective concentration of TRPV1 inhibition, had an equal analgesic ability with the APHC1 upon intramuscular administration and retained it for 13 hours of observation. The analgesic effect of APHC1 in a dose of 0.1 mg/kg when administered intramuscularly developed very quickly in 5 minutes, but lasted 3 hours. The differences in the pharmacodynamic profile of the peptides are in good agreement with different mechanisms of binding to TRPV1.

Keywords: sea anemone, *Heteractis crispa*, TRPV1, nociception, analgesia