

И. А. Дьяченко<sup>1, 2, 3</sup>, Г. И. Белоус<sup>1, 3</sup>, Л. А. Скобцова<sup>1, 3</sup>, Т. Ю. Жармухамедова<sup>1, 3</sup>,  
В. А. Паликов<sup>1, 3</sup>, Ю. А. Паликова<sup>1, 3</sup>, Е. В. Дьяченко<sup>1, 3</sup>, Е. А. Калабина<sup>1</sup>,  
В. Б. Руденко<sup>1</sup>, Я. А. Андреев<sup>4, 5</sup>, Ю. А. Логашина<sup>4, 5</sup>, С. А. Козлов<sup>4</sup>,  
А. Н. Яворский<sup>3, 6</sup>, А. Н. Мурашев<sup>1, 2, 3</sup>

## ОБЕЗБОЛИВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИПЕПТИДНОГО МОДУЛЯТОРА РЕЦЕПТОРА TRPV1

<sup>1</sup> ФГБУН филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Российская Академия наук, Россия, 142290, Московская область, Пушкино, Проспект науки д. 6.

<sup>2</sup> ФГБУН Пушкинский научный центр, Российская Академия наук, Россия, 142290, Московская область, Пушкино, Проспект науки, д. 3.

<sup>3</sup> ФГБУН Пушкинский государственный естественно-научный институт, Россия, 142290, Московская область, Пушкино, Проспект науки, д. 3.

<sup>4</sup> ФГБУН Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Российская Академия наук, Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

<sup>5</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России, Институт молекулярной медицины, Россия, Москва, 119991, ул. Трубецкая, д. 8.

<sup>6</sup> ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Минздрава России, Россия, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8; e-mail: dyachenko@bibch.ru

Представлены результаты исследования активности нового полипептидного модулятора TRPV1-рецепторов — АРНС2, выделенного из анемоны *Heteractis crispa*. Показано, что АРНС2 обладает анальгетическими свойствами, не нарушает нормальной двигательной активности и не изменяет температуру тела и гемостаз экспериментальных животных, что имеет большую практическую ценность для создания эффективных анальгетиков нового поколения. В исследовании гемодинамической активности наблюдается краткосрочное повышение ЧСС. Дальнейшее исследование особенностей связывания этого полипептида с рецептором TRPV1 может открыть подходы к созданию других антагонистов этого рецептора.

**Ключевые слова:** полипептидный модулятор; TRPV1-рецепторы; анальгетики.

Наиболее известным и изученным представителем семейства ионотропных рецепторов TRP является взаимодействующий с капсаицином рецептор TRPV1 [1, 2]. Рецептор TRPV1 играет значительную роль во многих биологических процессах, таких как восприятие внешней температуры (более 43 °С), развитие воспаления и терморегуляция [1, 2]. Активация TRPV1 приводит к возникновению боли, снижению температуры тела, усилению потоотделения и впоследствии к появлению повышенной чувствительности к болевым стимулам (гипералгезия) или болевых ощущений в ответ на неболевые раздражители (аллодиния) [1, 2]. Таким образом, рецептор TRPV1 является чрезвычайно интересной мишенью для поиска новых анальгетических и противовоспалительных препаратов.

Ранее нами обнаружены и охарактеризованы полипептидные модуляторы TRPV1 из экстракта морской анемоны *Heteractis crispa* (АРНС1 и АРНС3), которые проявляют выраженную анальгетическую активность и снижают температуру тела экспериментальных животных [3 – 7]. Также в этом экстракте найден полипептидный компонент, получивший название АРНС2, однако его биологическая активность детально не исследована. АРНС2 является слабым ингибитором сериновых протеаз и модулятором активности ванилоидного рецептора TRPV1 [5].

Полипептид АРНС2 получен методом гетерологичной экспрессии в составе гибридного с тиоредоксином белка в клетках *E. coli*. Для получения индивидуального пептида гибридный белок был очищен при помощи ме-

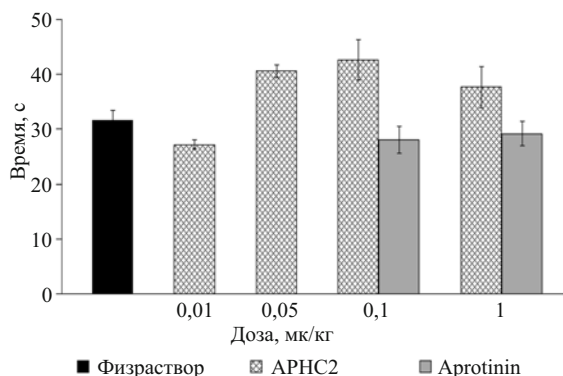
талл-аффинной хроматографии на  $\text{Co}^{2+}$ -сорбенте, расщеплен бромцианом и целевой продукт выделен высокоэффективной хроматографией с обращенной фазой, как было описано ранее [4, 5, 8]. Чистота полученного пептида по данным аналитической ВЭЖХ и масс-спектрометрии составляла > 96 %.

Настоящая работа посвящена изучению биологической активности этого полипептида на экспериментальных моделях.

### Экспериментальная часть

Исследование АРНС2 проводили на мышах-самцах CD-1 и крысах-самцах SD в возрасте 2 мес. Все манипуляции с мышами были рассмотрены и одобрены биоэтической комиссией ФИБХ РАН. Исследуемое вещество вводили внутривенно, предварительно растворив в стерильном физиологическом растворе, контрольной группе вводили физиологический раствор. Во всех экспериментах АРНС2 и контрольный раствор вводили за 15 мин до начала опыта.

В качестве основного теста для анализа изменения порога острой болевой чувствительности использовали тест "Горячая пластина" при температуре пластины 55 °С. Поскольку рецептор TRPV1 является одним из основных сенсоров болезненного температурного воздействия, "горячая пластина" является наиболее простым тестом для изучения антагонистов этого рецептора. Исследование на тепловую чувствительность проводили при внутривенном введении АРНС2 в дозах: 0,01, 0,05, 0,1 и 1 мг/кг. Анализ влияния полипептида АРНС2



**Рис. 1.** Обезболивающее действие полипептида АРНС2 в тесте “Горячая пластина” после внутривенного введения мышам CD-1. Здесь и на рис. 2–4: данные представлены в виде  $\bar{X} \pm SD$ ,  $n = 10$  для каждой группы; \*  $p < 0,05$  (Duncans test) относительно контрольной группы, получавшей физиологический раствор.

на температуру экспериментальных животных проводили методом измерения ректальной температуры. Седативное действие полипептида АРНС2 исследовали в тесте “открытое поле”.

Для анализа изменения гемодинамической активности использовали катетерную технологию регистрации артериального давления (АД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) на самцах крыс SD [11]. На момент времени 0 (до введения исследуемых полипептидов) и через 15 и 110 мин после введения полипептидов забирала кровь для анализа показателей гемостаза. Оценку активированного парциального (частичного) тромбoplastинового времени (АПТВ/АЧТВ), протромбинового времени и определение концентрации фибриногена осуществляли с помощью наборов и методов “НПО РЕНАМ”, Россия [12]. Полипептид АРНС2 вводили внутривенно в дозе 0,1 мг/кг крысам SD.

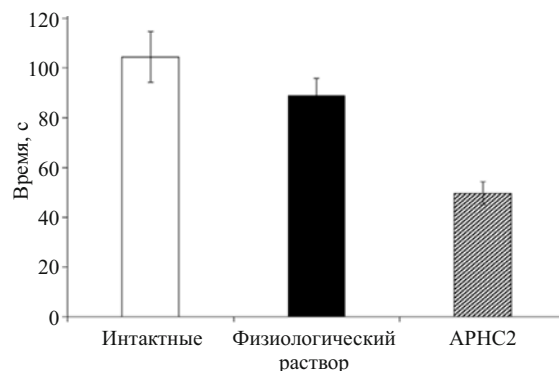
Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБХ, поддержанного Минобрнауки РФ, идентификатор соглашения RFMEFI 62117X0018.

### Результаты и их обсуждение

Результаты, полученные при исследовании влияния АРНС2 на тепловую чувствительность у мышей, представлены на рис. 1.

Полипептид АРНС2 в дозах 0,05 и 0,1 мг/кг достоверно увеличивал время нахождения на термостатируемой пластине на 28 и 35 % соответственно, по сравнению с животными контрольной группы. Максимальный эффект наблюдали при дозе 0,1 мг/кг. В то же время мощный ингибитор сериновых протеаз аprotинин (aprotinine, Sigma), обладающий схожей с АРНС2 пространственной структурой, не изменял поведенческую реакцию на тепловую стимуляцию в дозах 0,1 (11 %) и 1 (8 %) мг/кг относительно контрольной группы, получавшей физиологический раствор [5].

Селективным антагонистом TRPV1 рецепторов является капсаицин [9, 10]. Ранее показано, что мыши, нокаутированные по гену TRPV1, не чувствительны к капсаицину [9]. Введение капсаицина в подушечку лапы экспериментального животного вызывает болевое поведение: лизание и встряхивание лапы, в которую ввели капсаицин [14]. Внутривенное введение АРНС2



**Рис. 2.** Обезболивающее действие полипептида АРНС2 на модели боли, вызванной капсаицином, после внутривенного введения мышам CD-1.

(0,1 мг/кг) за 15 мин до инъекции капсаицина достоверно уменьшало время облизывания подушечки лапы (44 %) по сравнению с таковым контрольной группы (рис. 2).

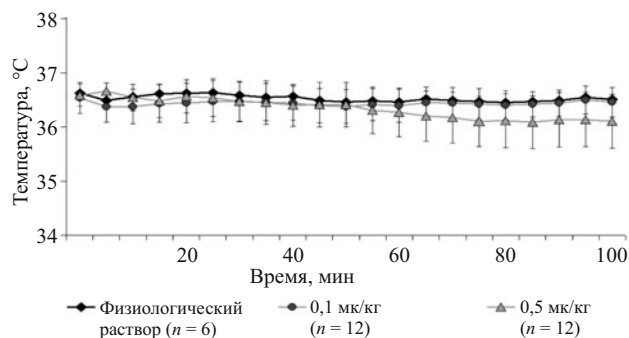
Серьезным препятствием для использования антагонистов TRPV1 рецепторов в клинической практике является их влияние на температуру тела [2]. Показано, что полипептид АРНС2 в дозе 0,1 мг/кг не изменяет нормальной температуры тела мышей при внутривенном введении. Таким образом, АРНС2 отличается от большинства ранее описанных пептидных и непептидных антагонистов рецептора TRPV1, которые влияют на терморегуляцию и изменяют нормальную температуру тела людей и животных (рис. 3).

Чтобы исключить потенциальное седативное действие полипептида АРНС2, его исследовали в тесте “открытое поле”. Основным показателем этого теста является локомоторная активность, которая включала такие параметры, как время передвижения и замирания. В максимально эффективной дозе, обладающей обезболивающим действием, равной 0,1 мг/кг, АРНС2 достоверно не изменяет нормальное поведение животных. В показателе пройденного расстояния наблюдается увеличение двигательной активности на 11 %, в показателе времени передвижения наблюдали увеличение на 4 %, полученные результаты достоверно не отличались от контрольной группы, получавшей физиологический раствор.

Таким образом, эффективность полипептида АРНС2 в болевых тестах не является результатом нарушения функционирования опорно-двигательного аппарата или седации.

Анализ гемодинамических показателей не выявил достоверных отличий от контроля по показателю АД после введения АРНС2. Гемодинамические исследования пептида АРНС2 в период 7–17 мин достоверно увеличивали ЧСС относительно исходного уровня на 20–25 % относительно исходного уровня (рис. 4). С наибольшей вероятностью можно предположить, что способность пептида изменять ЧСС напрямую связана с возможностью пептида изменять физиологическую температуру тела животных [7].

Введение полипептида АРНС2 не приводило к статистически достоверным изменениям в системе гемостаза. После введения АРНС2 показатель АПТВ/АЧТВ че-



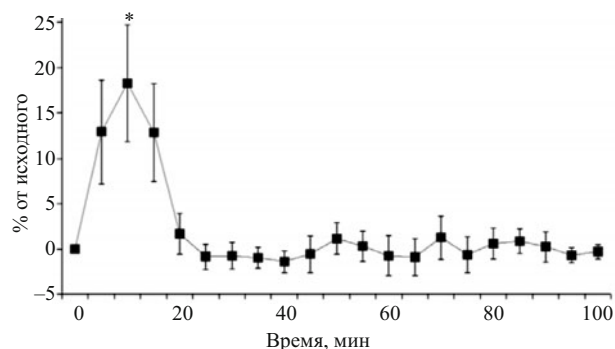
**Рис. 3.** Влияние полипептида АРНС2 на температуру тела мышей CD-1 после внутривенного введения пептида АРНС2 в дозе 0,1 мг/кг.

рез 15 мин снизился на 5 %, к 120 мин — до 10 % по сравнению с исходным уровнем. Протромбиновое время к 15 мин снизилось на 5 %, к 120 мин — на 14 %. Концентрация фибриногена изменилась незначительно: через 15 и 120 мин на 0,4 и 2,7 % соответственно.

Итак, исследуемый полипептид не оказывает влияние на систему гемостаза. Однако он вызывает статистически значимое изменение ЧСС у экспериментальных животных в дозах, соответствующих его максимальному анальгетическому эффекту.

Таким образом, АРНС2 обладает обезболивающим действием, не нарушает нормальную двигательную активность и не изменяет температуру тела экспериментальных животных, что имеет большую практическую ценность для создания эффективных анальгетиков нового поколения. Однако наблюдается краткосрочное изменение ЧСС с последующей нормализацией показателей. Дальнейшее исследование особенностей связывания этого полипептида с рецептором TRPV1 может открыть подходы к созданию обезболивающих лекарственных препаратов.

Работа поддержана грантом РФФИ (грант № 15-04-04666), программой фундаментальных исследований президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, а также грантом Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ ИШ-7676.2016.4.



**Рис. 4.** Влияние полипептида АРНС2 на ЧСС крыс SD после внутривенного введения пептида АРНС2 в дозе 0,1 мг/кг.

## ЛИТЕРАТУРА

1. A. Szallasi, D. N. Cortright, C. A. Blum S. R. Eid, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**(5), 357 – 372 (2007).
2. Y. A. Andreev, A. A. Vassilevski, S. A. Kozlov, *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, **6**(1), 35 – 45 (2012).
3. Y. A. Andreev, S. A. Kozlov, S. G. Koshelev, et al., *J. Biol. Chem.*, **283**(35), 23914 – 23921 (2008).
4. Y. A. Andreev, S. A. Kozlov, E. P. Kozlovskaya, et al., *Dokl. Biochem. Biophys.*, **424**, 46 – 48 (2009).
5. S. A. Kozlov, Y. A. Andreev, A. N. Murashev, et al., *Rus. J. Bioorg. Chem.*, **35**(6), 711 – 719 (2009).
6. I. B. Philyppov, O. N. Paduraru, Y. A. Andreev, et al., *Life Sci.*, **91**(19 – 20), 912 – 920 (2012).
7. Y. A. Andreev, S. A. Kozlov, Y. V. Korolkova, et al., *Mar. Drugs.*, **11**(12), 5100 – 5115 (2013).
8. Y. A. Andreev, S. A. Kozlov, A. A. Vassilevski, E. V. Grishin, *Anal. Biochem.*, **407**(1), 144 – 146 (2010).
9. M. J. Caterina, A. Leffler, A. B. Malmberg, et al., *Science*, **288**(5464), 306 – 313 (2000).
10. N. R. Gavva, R. Tamir, Y. Qu, L. Klionsky, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **313**(1), 474 – 784 (2005).
11. И. А. Дьяченко, О. Н. Хохлова, Т. Ю. Жармухамедова, А. Н. Мурашев, *Учебное пособие*, Изд-во ТулГУ, Тула (2013).
12. А. Н. Мамаев, *Тромбоз, гемостаз и реол.*, № 3, 78 (2004).
13. И. А. Дьяченко, Я. А. Андреев, Ю. А. Логашина и др., *Докл. акад. наук*, **465**(2), 252 – 254 (2015).
14. Д. А. Бондаренко, И. А. Дьяченко, Д. И. Скобцов и др., *Биомедицина*, **1**(2), 84 – 94 (2011).

Поступила 23.12.16

## ANALGESIC ACTIVITY OF A POLYPEPTIDE MODULATOR OF TRPV1 RECEPTOR

I. A. D'yachenko<sup>1,2,3\*</sup>, G. I. Belous<sup>1,3</sup>, L. A. Skobtsova<sup>1,3</sup>, T. Yu. Zharmukhamedova<sup>1,3</sup>, V. A. Palikov<sup>1,3</sup>, Yu. A. Palikova<sup>1,3</sup>, E. V. D'yachenko<sup>1,3</sup>, E. A. Kalabina<sup>1</sup>, V. B. Rudenko<sup>1</sup>, Ya. A. Andreev<sup>4,5</sup>, Yu. A. Logashina<sup>4,5</sup>, S. A. Kozlov<sup>4</sup>, A. N. Yavorskii<sup>3,6</sup>, and A. N. Murashev<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Pushchino Branch of the Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

<sup>2</sup> Pushchino Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

<sup>3</sup> Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

<sup>4</sup> Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

<sup>5</sup> Institute of Molecular Medicine, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

<sup>6</sup> Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russia

\* e-mail: dyachenko@bibch.ru

We present results of studying the activity of APHC2, a new polypeptide modulator of TRPV1 receptors, which was isolated from *Heteractis crispa* anemones. It is established that APHC2 has analgesic properties, does not disturb normal locomotor activity of experimental animals, and does not change their body temperature and hemostasis. This compound can be of great practical value for creating a new generation of effective analgesic drugs. Short increase in heart rate has been observed in the study of hemodynamic activity. Further investigation of the characteristics of APHC2 polypeptide binding to TRPV1 receptor may also open approaches to finding other antagonists of this receptor.

**Keywords:** polypeptide modulator; APHC2; TRPV1 receptors; analgesics.