

Ю. А. Паликова^{1, 3}, Л. А. Скобцова^{1, 3}, Т. Ю. Жармухамедова¹,
В. А. Паликов^{1, 3}, В. Б. Руденко¹, О. Н. Хохлова^{1, 2}, А. В. Лобанов^{1, 2},
Д. И. Ржевский^{1, 2}, Г. А. Слащева¹, Е. В. Дьяченко³, Г. И. Белоус³,
Я. А. Андреев^{4, 5}, Ю. А. Логашина^{4, 5}, С. А. Козлов⁴, А. Н. Яворский³,
Е. Г. Елякова⁴, И. А. Дьяченко^{1, 2, 3}

ВЛИЯНИЕ НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МЫШЕЙ НОВЫХ ПЕРСПЕКТИВНЫХ АНАЛЬГЕТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

¹ 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.

² ФГБУН Пушинский научный центр, Российская академия наук, Россия, 142290, Московская область, Пушкино, Проспект Науки, д. 3.

³ ФГБУН Пушинский государственный естественно-научный институт, Россия, 142290, Московская область, Пушкино, Проспект Науки, д. 3; e-mail: dyachenko@bibch.ru

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

⁵ Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава РФ, Институт молекулярной медицины, Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8.

Проведено исследование влияния на поведение самцов мышей ICR новых потенциальных обезболивающих соединений пептидной (АРНСЗ и РТ1) и непептидной (севанол) природы. Все исследуемые вещества в тесте “открытое поле” не оказывали влияния на поведение мышей в дозах, вызывающих эффективную анальгезию. Однако АРНСЗ оказывает седативное действие на мышей в дозах, в 10000 раз превышающих фармакологически активную. Тогда как севанол в дозе в 35 мг/кг вызывал достоверное изменение поведения относительно фармакологически активной дозы 1 мг/кг, но не от контроля.

Ключевые слова: полипептиды; рецепторы TRPV1; ASIC; P₂X₃; двигательная активность; седативный эффект.

Одним из перспективных подходов поиска новых анальгетиков является использование высокоселективных веществ, способных специфично блокировать рецепторы, которые непосредственно воспринимают различные виды болевых стимулов. К таким рецепторам относятся P₂X₃, TRPV1 и ASIC рецепторы.

Целью исследования было изучение влияния новых анальгетических соединений на центральную нервную систему (ЦНС) в поведенческом тесте.

Экспериментальная часть

Полипептидный анальгетик РТ1 (модулятор рецепторов P₂X₃) был выделен из яда среднеазиатского паука *Geolycosa sp.* в ИБХ РАН под руководством академика Е. В. Гришина [1]. РТ1 имеет следующую аминокислотную последовательность: GYCAEKGIRCDDIH CCTGLKCKCNASGYNCVCRKK (UniProtKB/Swiss-Prot: P86269.1). Пептид РТ1 состоит из 35 аминокислотных остатков и может быть получен с помощью пептидного синтеза и генно-инженерными методами [1, 2]. В исследовании использовали рекомбинантный аналог полипептида, полученный в ИБХ РАН (Москва, РФ). В экспериментах на моделях боли у животных РТ1 проявлял обезболивающие эффекты в дозах ~ 0,01 мг/кг [3]. Те же эффекты были показаны для антагониста P₂X₃ А-317491 [4], однако для достижения сходного биологического действия вещество необходимо применять в концентрациях на 3 порядка выше.

Полипептидный анальгетик АРНСЗ (лиганд рецепторов TRPV1, которые участвуют в возникновении болевых синдромов) был выделен из яда тропической анемоны *Heteractis crispa* в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН. Структура АРНСЗ определена секвенированием по Эдману после предварительного восстановления дисульфидных связей и алкилирования винилпипридином [5]. Первичная структура полипептида АРНСЗ, состоящего из

Таблица 1
Параметры двигательной активности мышей, измеряемые в тесте TSE Multi Conditioning System Extended Advanced

Время неподвижности, с	Дистанция на периферии, м
Время неподвижности, % от общего времени	Дистанция на периферии, % от общей дистанции
Время передвижения, с	Дистанция в центре, м
Время передвижения, % от общего времени	Время в центре, с
Дистанция, м	Количество визитов в центр
Время в центре, с	Умывания в центре
Время в центре, % от общего времени	Количество изменений центра тяжести
Дистанция в центре, м	Скорость во время передвижения, м/с
Дистанция в центре, % от общей дистанции	Скорость за общее время, м/с
Время на периферии, с	Умывания в центре, с
Время на периферии, % от общего времени	

Двигательная активность мышей ICR в тесте “открытое поле” на установке TSE Multi Conditioning System Extended Advanced через 1 час после внутримышечного введения полипептида АРНСЗ

Параметр	Контрольная группа (n = 12)	АРНСЗ	
		0,01 мг/кг (n = 12)	100 мг/кг (n = 12)
Время неподвижности, с	55,6 ± 1,9	59,9 ± 2,3	64,9 ± 1,9 *
Время неподвижности, % от общего времени	30,9 ± 1,0	33,3 ± 1,3	36,0 ± 1,0 *
Время передвижения, с	124,4 ± 1,9	120,0 ± 2,3	115,1 ± 1,9 *
Время передвижения, % от общего времени	69,1 ± 1,0	66,6 ± 1,3	63,9 ± 1,0 *
Дистанция, м	27,5 ± 1,0	26,5 ± 1,0	23,3 ± 0,6 *
Время в центре, с	14,6 ± 2,2	12,2 ± 1,7	14,7 ± 2,8
Время в центре, % от общего времени	8,1 ± 1,2	6,7 ± 0,9	8,2 ± 1,5
Дистанция в центре, м	3,9 ± 0,6	3,1 ± 0,5	2,9 ± 0,4
Дистанция в центре, % от общей дистанции	14,2 ± 1,2	11,4 ± 1,5	12,9 ± 1,9
Время на периферии, с	165,3 ± 2,2	167,8 ± 1,7	165,2 ± 2,8
Время на периферии, % от общего времени	91,8 ± 1,2	93,2 ± 0,9	91,8 ± 1,5
Дистанция на периферии, м	23,4 ± 0,9	23,3 ± 0,8	20,23 ± 0,9
Дистанция на периферии, % от общей дистанции	85,8 ± 1,9	88,6 ± 1,6	87,1 ± 1,9
Количество изменений центра тяжести	3262,4 ± 88,3	3110,6 ± 100,5	2850,3 ± 65,8*
Скорость во время передвижения, м/с	0,2 ± 0,0	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,0
Скорость за общее время, м/с	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0

Данные представлены как среднее арифметическое ± ошибка среднего арифметического; n — количество животных в группе; * p < 0,05, статистический анализ проводили с использованием теста ANOVA (Duncan-test) относительно контрольной группы (физиологический раствор).

56 а.о.: GSICLEPKVVGPCATAYFPRFYFNSETGKCTPF IYGGCEGNGNMFETLRACRGICRA (UniProtKB/Swiss-Prot: C0HJF3.1). В работе использовали рекомбинантный аналог полипептида, полученный в ИБХ РАН (Москва, РФ). При моделировании различных болевых синдромов на животных АРНСЗ показал анальгезирующую активность в дозах 0,01 – 0,1 мг/кг. Подобные эффекты были описаны для антагонистов рецептора ТКРV1 [6], но достижение аналогичной эффективности возможно при увеличении дозы на 2 порядка.

Из чабреца *Thymus armeniacus* выделено новое низкомолекулярное соединение Севанол (1R,2S)-1-[(1R,2S)-1-(3,4-дигидроксибензил)-6,7-дигидрокси-3-[(1R,2S)-1,2,3-трикарбокситпропокси]карбонил-1,2-дигидронафтален-2-карбонил]оксипропан-1,2,3-трикарбоксовая кислота (синтезируется ИБХ РАН, Москва, РФ), действующий в физиологически допустимых концентрациях на обе компоненты тока ASIC3 канала. В тестах тепловой гиперчувствительности и кислотной стимуляции боли *in vivo* продемонстрирован обезболивающий эффект для севанола [7, 8].

Исследование поведенческой активности проводили на самцах мышей ICR (получены из Питомника лабораторных животных “Пушино”) в возрасте 2 мес. Все манипуляции с животными были рассмотрены и одобрены биоэтической Комиссией ФИБХ РАН.

Двигательную активность экспериментальных животных исследовали на компьютеризированной системе TSE Multi Conditioning System Extended Advanced (США). Установка позволяет изучать поведение экспериментальных животных без участия экспериментатора. Тестирование проводили через 60 мин после внутримышечного введения исследуемых анальгетиков,

его продолжительность составляла 3 мин. Была использована программа наблюдения за поведением животных TSE ActiMot (Activity & Hole Board Measuring System), параметры регистрации двигательной активности перечислены в табл. 1. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП № 14.621.21.0018.

Результаты и их обсуждение

Все исследуемые вещества в фармакологически активной (анальгетической) дозе, АРНСЗ 0,01 мг/кг, РТ1 0,01 мг/кг и севанол 1 мг/кг не оказывали действия на поведение лабораторных животных. Увеличение дозы полипептида АРНСЗ в 10 тыс. раз незначительно, но достоверно, изменяло параметры двигательной активности относительно контрольной группы, получавшей физиологический раствор; достоверных отличий от фармакологически активной дозы не наблюдали (табл. 2).

Низкомолекулярное соединение севанол в фармакологически активной дозе (1 мг/кг) не изменяло двигательную активность экспериментальных животных. Поведение животных при увеличении дозы до 35 мг/кг достоверно не отличалось от контрольной группы, получавшей физиологический раствор, но были выявлены достоверные отличия поведенческой активности относительно дозы 1 мг/кг. Эти отличия связаны с тенденцией повышения параметров двигательной активности после введения дозы 1 мг/кг относительно контрольной группы, и наоборот снижением параметров двигательной активности после введения дозы 35 мг/кг (табл. 3).

Наиболее инертным в отношении центральной нервной системы оказался полипептид РТ1, который

Двигательная активность мышей ICR в тесте “открытое поле” на установке TSE Multi Conditioning System Extended Advanced через 1 ч после внутримышечного введения севанола

Параметр	Контрольная группа (n = 12)	Севанол	
		1 мг/кг (n = 12)	35 мг/кг (n = 12)
Время неподвижности, с	62,9 ± 3,2	54,7 ± 3,7	72,3 ± 4,9 [#]
Время неподвижности, % от общего времени	34,9 ± 1,8	30,4 ± 2,0	40,2 ± 2,7 [#]
Время передвижения, с	117,0 ± 3,2	125,3 ± 3,7	107,7 ± 4,9 [#]
Время передвижения, % от общего времени	65,0 ± 1,8	69,6 ± 2,1	59,8 ± 2,7 [#]
Дистанция, м	24,5 ± 1,6	28,6 ± 1,8	20,7 ± 1,3 [#]
Время в центре, с	13,7 ± 1,9	17,0 ± 3,3	18,6 ± 2,5
Время в центре, % от общего времени	7,6 ± 1,1	9,5 ± 1,9	10,3 ± 1,4
Дистанция в центре, м	3,0 ± 0,5	3,9 ± 0,8	2,5 ± 0,4
Дистанция в центре, % от общей дистанции	12,2 ± 1,5	13,6 ± 2,4	11,5 ± 1,3
Время на периферии, с	166,3 ± 1,9	162,9 ± 3,3	161,4 ± 2,5
Время на периферии, % от общего времени	92,4 ± 1,1	90,5 ± 1,8	89,7 ± 1,4
Дистанция на периферии, м	21,5 ± 1,4	24,7 ± 1,7	18,2 ± 1,1 [#]
Дистанция на периферии, % от общей дистанции	87,8 ± 1,5	86,4 ± 2,4	88,5 ± 1,3
Количество изменений центра тяжести	3039,0 ± 118,5	3422,9 ± 172,8	2657,3 ± 146,3 [#]
Количество визитов в центр	13,6 ± 3,2	18,2 ± 3,5	10,3 ± 2,1
Скорость во время передвижения, м/с	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01
Скорость за общее время, м/с	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,01 ^{*#}

Данные представлены как среднее арифметическое ± ошибка среднего арифметического; n — количество животных в группе; p < 0,05, статистический анализ проводили с использованием теста ANOVA-1 (Duncan-test) относительно: * контрольной группы; # группы севанола в дозе 1 мг/кг.

достоверно не изменял поведения экспериментальных животных (n = 12), как в фармакологически активной дозе (0,01 мг/кг) так и при ее увеличении в 10 тыс. раз.

Работа проведена при поддержке Программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

ЛИТЕРАТУРА

1. E. V. Grishin, G. A. Savchenko, A. A. Vassilevski, et al., *Ann. Neurol.*, **67**(5), 680 – 683 (2010).
2. А. А. Василевский, Г. А. Савченко, Ю. В. Королькова и др., Патент РФ № 2422459 (2011).

3. N. V. Kabanova, A. A. Vassilevski, O. A. Rogachevskaja, et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1818**, 2868 – 2875 (2012).
4. H. Gunosewoyo and M. Kassiou, *Expert Opin Ther. Pat.*, **20**, 625 – 646 (2010).
5. S. A. Kozlov, Y. A. Andreev, A. N. Murashev, et al., *Rus. J. Bioorgan. Chem.*, **35**(6), 711 – 719 (2009).
6. Y. A. Andreev, S. A. Kozlov, Y. V. Korolkova, et al., *Mar. Drugs*, **11**(12), 5100 – 5115 (2013).
7. M. A. Dubinnyi, D. I. Osmakov, S. G. Koshelev, et al., *J. Biol. Chem.*, **287**, 32993 – 33000 (2012).
8. D. I. Osmakov, S. A. Kozlov, Y. A. Andreev, et al., *J. Biol. Chem.*, **288**, 23116 – 23127 (2013).

Поступила 03.02.18

STUDYING THE INFLUENCE OF NEW PROMISING ANALGESIC COMPOUNDS ON THE BEHAVIOR OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Yu. A. Palikova^{1,3}, L. A. Skobtsova^{1,3}, T. Yu. Zharmukhamedova^{1,3}, V. A. Palikov^{1,3}, V. B. Rudenko¹, O. N. Khohlova^{1,2}, A. V. Lobanov^{1,2}, D. I. Rzhnevskii^{1,2}, G. A. Slashcheva¹, E. V. D'yachenko³, G. I. Belous³, Ya. A. Andreev^{4,5}, Yu. A. Logashina^{4,5}, S. A. Kozlov⁴, A. N. Yavorskii³, E. G. Elyakova⁴, and I. A. D'yachenko^{1,2,3*}

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Pushchino Branch), Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

² Pushchino Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

³ Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

⁴ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

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

* e-mail: dyachenko@bibch.ru

The influence of new promising analgesic polypeptide compounds APCH3 (TRPV1 receptor inhibitor) and PT1 (P2X3 receptor inhibitor) and nonpeptide (small-molecule) plant lignan drug sevanol (ASIC3 receptor inhibitor) on the behavior of ICR male mice has been studied. All substances did not influence the behavior of mice in the open-field test in doses producing significant analgesic effect. However, APCH3 produced sedative effect in mice at doses 10,000 times higher than those used in the study of pharmacological activity. At the same time, sevanol in a dose of 35 mg/kg caused reliable change in the behavior of test mice as compared to the action of pharmacologically active dose (1 mg/kg), but not in comparison to the untreated control group.

Keywords: polypeptides; TRPV1 receptor; ASIC receptor; P2X3 receptor; locomotor activity; sedative effect.