

## АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕРМОРФИНА И ЕГО ПРОЛИНОВЫХ АНАЛОГОВ

Л. С. Гузевых<sup>1</sup>, Д. В. Валуйских<sup>1</sup>, Т. А. Воронина<sup>1</sup>, Т. Г. Емельянова<sup>2</sup>, Л. А. Андреева<sup>3</sup>, Л. Ю. Алфеева<sup>3</sup>, С. Б. Середенин<sup>1</sup>, Н. Ф. Мясоедов<sup>3</sup>

Изучена анальгетическая активность дерморфина (Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>; ДМ) и его аналогов, полученных стереохимической модификацией L-Pro<sup>6</sup> в молекуле ДМ на D-Pro<sup>6</sup> — пептид [DPro<sup>6</sup>]ДМ, и путем дегидрирования L-Pro<sup>6</sup> — пептид [dHPro<sup>6</sup>]ДМ. В исследовании использовали тесты, характеризующие различные уровни организации болевой чувствительности. Пептиды вводили в дозах 0,1; 1 и 10 мг/кг внутривнутрибрюшинно. Показано, что ДМ и [DPro<sup>6</sup>]ДМ вызывают анальгезию в тесте корчей, вызванных уксусной кислотой. [dHPro<sup>6</sup>]ДМ в данном тесте проявлял аналогичную активность, но в больших дозах. В тесте зажима основания хвоста [dHPro<sup>6</sup>]ДМ был неактивен. В тесте раздражения лапы крысы электрическим током [DPro<sup>6</sup>]ДМ вызывал анальгезию в меньших дозах, чем [dHPro<sup>6</sup>]ДМ. Таким образом, все исследуемые пептиды обладают выраженным анальгетическим действием, причем замена L-Pro<sup>6</sup> в молекуле ДМ на его стереоизомер (D-Pro) более эффективна, чем его замена на dHPro<sup>6</sup>.

**Ключевые слова:** дерморфин, болевая чувствительность, анальгетическое действие

### ВВЕДЕНИЕ

Дерморфины — группа эндогенных опиоидных пептидов, выделенных из кожи лягушек семейства *Phyllomedusinae* [7, 8], которые обладают высоким сродством к  $\mu$ -опиоидным рецепторам [5] и вызывают сильную анальгезию [6, 11]. Ранее нами при изучении пролиновых аналогов дерморфина (ДМ) показано, что структурные изменения Pro<sup>6</sup> могут привести к усилению анальгетической активности [1, 3]. Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение анальгетической активности ДМ и его аналогов, полученных стереохимической модификацией L-Pro<sup>6</sup> в молекуле ДМ на D-Pro<sup>6</sup> изомер — пептид [DPro<sup>6</sup>]ДМ, и путем дегидрирования L-Pro<sup>6</sup> — пептид [dHPro<sup>6</sup>]ДМ в различных тестах оценки болевой чувствительности, характеризующих разные уровни ее организации.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на самцах беспородных белых мышей массой 20 – 25 г и самцах нелинейных белых крыс массой 200 – 250 г. Всего было использовано 250 мышей и 360 крыс. Дерморфин и его аналоги [DPro<sup>6</sup>]ДМ и пептид [dHPro<sup>6</sup>]ДМ вводили внутривнутрибрюшинно в дозах 0,1; 1 и 10 мг/кг. Контрольным животным вводили эквивалентный объем дистиллированной воды. Вещества вводили из расчета 1 мл на 1 кг массы крыс и 1 мл на 100 г массы мышей. Болевую чувствительность животных оценивали на модели корчей, вызванных уксусной кисло-

той; при раздражении лап крыс электрическим током и при механическом сдавливании основания хвоста крыс.

*Корчи, вызванные уксусной кислотой.* Мышей помещали в индивидуальные боксы. Пептиды вводили за 20 мин до введения 0,6 % раствора уксусной кислоты. Регистрировали число корчей на протяжении 30 мин после введения уксусной кислоты [4].

*Раздражение лап электрическим током.* Крысу помещали в камеру с электродным полом размером 39 × 39 × 39 см. Наносили неизбегаемое постепенно увеличивающееся электроболевое раздражение и регистрировали пороговую силу тока, когда животное реагировало вокализациями. Тестирование проводили дважды через 20 и 40 мин после введения пептидов.

*Механическое сдавливание основания хвоста.* Врожденную оборонительную реакцию крыс на защемление корня хвоста зажимом Гаффнера оценивали по модифицированной методике Haffner [10], используя 3-балльную шкалу: 0 — отсутствие реакции, 1 — вздрагивание, 2 — побежка вперед, 3 — “скручивание” к основанию хвоста и кусание зажима. Пептиды вводили за 20 мин до тестирования. Результаты исследований обрабатывали статистически при помощи непараметрического критерия Вилкоксона — Манна — Уитни, используя пакет программ Microsoft Excel 2002.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Тест корчей, вызванных уксусной кислотой, моделирует ситуацию возникновения боли при раздражении висцеральных ноцицепторов брюшной полости. В контрольной группе среднее число корчей составило  $35,8 \pm 19$  (рисунок, а). В дозе 0,01 мг/кг ДМ, [dHPro<sup>6</sup>]ДМ и [DPro<sup>6</sup>]ДМ не изменяли болевую чувствительность. В дозах 0,1; 1 и 10 мг/кг ДМ и его пролиновые аналоги вызвали дозо-зависимое снижение числа корчей. Так, в дозе 0,1 мг/кг введение ДМ, [dHPro<sup>6</sup>]ДМ и [DPro<sup>6</sup>]ДМ уменьшало число корчей до 42,7; 64,2 и 22,3 % относительно уровня контрольной группы соответственно. При введении пептидов в дозе 1 мг/кг процент корчей в группе животных, которым вводили ДМ снизился до 6,8 %, в группе мышей, кото-

<sup>1</sup> Лаборатория психофармакологии (зав. — проф. Т. А. Воронина) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

<sup>2</sup> Лаборатория структурной организации биологических систем (зав. — проф. А. В. Шишков) Института химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва, 119991, ул. Косыгина, 4.

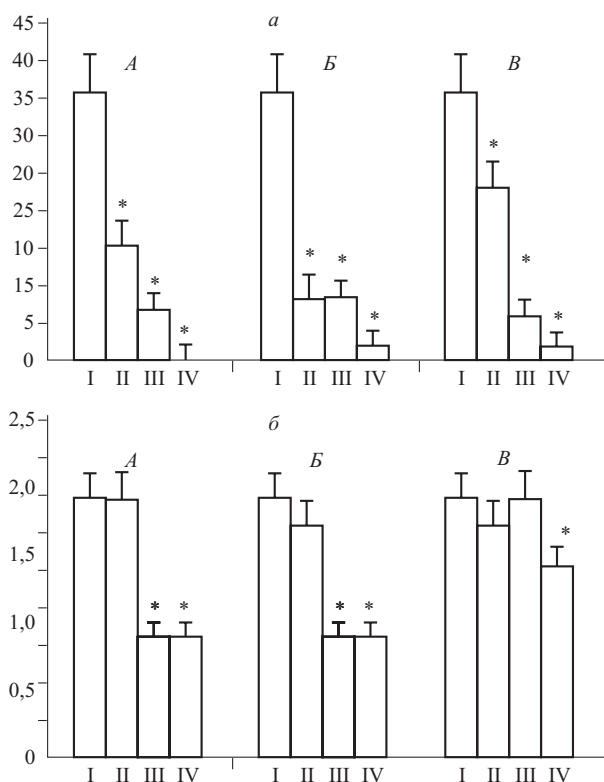
<sup>3</sup> Сектор регуляторных пептидов (зав. — Л. А. Андреева) Института молекулярной генетики РАН, Москва, 123182, пл. Курчатова, 2.

рым вводили [dHPro<sup>6</sup>]ДМ — до 5,9 % и у животных, которые получали [DPro<sup>6</sup>]ДМ — до 8,6 %. При увеличении дозы пептидов до 10 мг/кг у мышей, получавших ДМ, корчи не наблюдались, в группе животных, получавших [dHPro<sup>6</sup>]ДМ, регистрировали 1,6 % корчей, а в группе мышей, получавших [DPro<sup>6</sup>]ДМ — 1,8 % корчей относительно контрольной группы. Таким образом, ДМ и его пролиновые аналоги [dHPro<sup>6</sup>]ДМ и [DPro<sup>6</sup>]ДМ обладают дозо-зависимой анальгетической активностью в тесте корчей, вызванных уксусной кислотой. Статистически достоверных различий в активности ДМ в сравнении с аналогами не выявлено.

Тест зажима основания хвоста основан на врожденной реакции “скручивания” животного к основанию хвоста при механическом раздражении. В контрольной группе крыс реакция на болевое воздействие составляла 1,9 ± 0,18 балла (рисунок, б). Введение ДМ и [DPro<sup>6</sup>]ДМ оказывало сходное влияние на болевую чувствительность. В дозе 0,1 мг/кг пептиды не проявляли активности, тогда как в дозах 1 и 10 мг/кг развивалась выраженная анальгетическая реакция. [dHPro<sup>6</sup>]ДМ был эффективен только в дозе 10 мг/кг. Таким образом, в тесте зажима основания хвоста по методу Гаффнера ДМ и [DPro<sup>6</sup>]ДМ проявляли большую активность в сравнении с [dHPro<sup>6</sup>]ДМ.

В тесте раздражения лап электрическим током в контрольной группе животных через 20 мин после введения воды вокализация наблюдалась при использовании тока 0,13 мА, а через 40 мин — 0,16 мА (таблица). ДМ не вызывал снижения болевой чувствительности по сравнению с контролем (таблица). В противоположность ДМ [DPro<sup>6</sup>]ДМ оказывал выраженный, статистически достоверный анальгетический эффект в широком диапазоне доз как через 20, так и через 40 мин после введения. Активность другого аналога ДМ, [dHPro<sup>6</sup>]ДМ проявлялась только в дозе 10 мг/кг и только через 40 мин после введения. Таким образом, природный ДМ оказался неэффективным в тесте болевого раздражения лап крыс электрическим током. Высокой анальгетической активностью обладал аналог ДМ [DPro<sup>6</sup>]ДМ, который значительно превосходил по эффективности [dHPro<sup>6</sup>]ДМ.

Проведенные исследования анальгетической активности аналогов дерморфина показали, что замена L-Pro<sup>6</sup> в молекуле дерморфина на его изомер D-Pro<sup>6</sup> вызывает усиление анальгетической активности пептида. Подобное влияние, хотя и не столь выраженное, оказывает дегидрирование LPro<sup>6</sup>. [DPro<sup>6</sup>]ДМ снижает порог болевой чувствительности в дозах более низких, чем [dHPro<sup>6</sup>]ДМ в тестах зажима основания хвоста и раздражения электрическим током лап, а также, как нами было ранее показано, в тесте отдергивания хвоста [1, 3]. В тесте корчей, вызванных уксусной кислотой, ДМ и его пролиновые аналоги проявляют сходную активность. Таким образом, в тестах изучения болевой чувствительности стереохимическая модифика-



Влияние дерморфина (А) и его аналогов [DPro<sup>6</sup>]дерморфина (Б) и [dHPro<sup>6</sup>]дерморфина (В) на болевую чувствительность мышей в тесте корчей, вызванных уксусной кислотой (а) и в тесте механического раздражения основания хвоста (по Гаффнеру) (б).

По оси ординат: а — количество корчей за 30 мин наблюдения; б — реакция на болевое воздействие в баллах. По оси абсцисс: I — контрольная группа, II — пептиды в дозе 0,1 мг/кг, III — в дозе 1 мг/кг, IV — в дозе 10 мг/кг. \* — отличия достоверны относительно контрольной группы при  $p < 0,05$ .

ция LPro<sup>6</sup> на DPro<sup>6</sup> оказывается более эффективной, чем на dHPro<sup>6</sup>.

Тест корчей, вызванных уксусной кислотой, является висцеральной воспалительной моделью боли (мо-

**Активность дерморфина (ДМ) и его аналогов [dHPro<sup>6</sup>]ДМ и [DPro<sup>6</sup>]ДМ в тесте болевой реакции на раздражение лап электрическим током**

Вещество	Дозы, мг/кг	Сила тока (мА), вызывающая вокализацию после введения веществ	
		через 20 мин	через 40 мин
Контроль	—	0,13 ± 0,041	0,16 ± 0,048
ДМ	0,1	0,129 ± 0,041	0,127 ± 0,036
	1	0,124 ± 0,039	0,143 ± 0,041
	10	0,136 ± 0,042	0,170 ± 0,035
	[DPro <sup>6</sup> ]ДМ	0,1	0,148 ± 0,045
[DPro <sup>6</sup> ]ДМ	1	0,16 ± 0,047	0,178 ± 0,043
	10	0,154 ± 0,046	0,225 ± 0,048*
	[dHPro <sup>6</sup> ]ДМ	0,1	0,198 ± 0,051*
[dHPro <sup>6</sup> ]ДМ	1	0,185 ± 0,050*	0,272 ± 0,051*
	10	0,285 ± 0,052*	0,266 ± 0,050*

\* различия достоверны по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

дель острого перитонита). При раздражении висцеральных рецепторов уксусной кислотой наблюдается сокращение абдоминальной мускулатуры, экстензия задних конечностей и вытягивание тела [2, 4, 9]. Раздражение терморепцепторов хвоста приводит к развитию спинального рефлекса отдергивания хвоста [4]. Раздражение механорецепторов основания хвоста приводит к возникновению врожденной реакции “скручивания” к основанию хвоста и кусанию зажима [10]. Подобная реакция требует вовлечение в реализацию рефлекса спинного мозга и ствола мозга. Раздражение электрическим током лап до появления вокализации является более сложным рефлексом в ответ на генерализованное раздражение электрическим током и всех сенсорных рецепторов и нервных волокон конечностей. В его реализации также участвуют спинной мозг и ствол мозга, поскольку в продолговатом мозге находится центр вокализации крысы [2]. Самый сложный из представленных рефлексов — лизание лапы при помещении на горячую пластину требует вовлечение в реализацию этой реакции вышележащих структур центральной нервной системы (корковых и подкорковых образований) [2, 4, 9]. В этом тесте анальгетическая активность соединений является наименьшей и не зависит от концентрации вводимых пептидов [1]. Во всех использованных тестах, характеризующих различные типы болевых рецепторов и проводящих путей болевой чувствительности, ДМ, [dHPro<sup>6</sup>]ДМ и, особенно, [DPro<sup>6</sup>]ДМ обладают выраженной анальгетической активностью. Значительно меньшую активность ДМ, [DPro<sup>6</sup>]ДМ и [dHPro<sup>6</sup>]ДМ имеют в тесте горячей пластины, характеризующимся самой сложной организацией рефлекса на супраспинальном уровне.

## ВЫВОДЫ

1. Модификация L-Pro<sup>6</sup> в молекуле дерморфина (ДМ) на dHPro<sup>6</sup> и, особенно на D-Pro<sup>6</sup>, приводит к рас-

ширению спектра анальгетических эффектов и значительному усилению анальгетической активности.

2. Аналоги дерморфина — [DPro<sup>6</sup>]ДМ и [dH-Pro<sup>6</sup>]ДМ оказывают анальгетическое действие в тестах, характеризующих различные типы болевых рецепторов и проводящих путей болевой чувствительности (уксусные корчи, зажим основания хвоста, раздражение лап электрическим током).

3. Дерморфин обладает более узким, в сравнении с его аналогами, спектром анальгетических эффектов, не оказывая действия в тесте раздражения лап электрическим током.

Работа выполнена при поддержке программы по “Физико-химической биологии” и Регионального общественного фонда содействия отечественной медицине.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Л. С. Гузевых, Т. Г. Емельянова, А. Б. Усенко и др., *Известия АН, Серия Биологическая*, № 4, 472 – 476. (2002).
2. Л. В. Калужный, *Физиологические механизмы регуляции болевой чувствительности*, Москва (1984).
3. M. Broccardo, A. V. Usenko, M. G. Uranova, et al., *Peptides*, **24**(3), 419 – 428 (2003).
4. S. S. Choi, K.-J. Han, H.-K. Lee, et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**(9), 1283 – 1288 (2003).
5. G. Giagnoni, D. Parolaro, L. Casiraghi, et al., *Neuropeptides*, **5**(1 – 3), 157 – 160 (1984).
6. P. Melchiorri and L. Negri, *Gen. Pharmacol.*, **27**(7), 1099 – 1107 (1996).
7. G. Mignogna, C. Severini, M. Simmaco, et al., *FEBS Lett.*, **302**(2), 151 – 154 (1992).
8. P. C. Montecucchi, R. de Castiglione, S. Piani, et al., *Int. J. Pept. Protein. Res.*, **17**(3), 275 – 283 (1981).
9. W. Riedel and G. Neeck, *Z. Rheumatol.*, № 60, 404 – 415 (2001).
10. M. Takeda, H. Inoue, K. Noguchi, et al., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **40**(5), 1186 – 1190 (1992).
11. S. Vönhof, B. D. Gudka, and A. L. Siren, *Eur. J. Pharmacol.*, **459**(1), 41 – 48 (2003).

Поступила 12.03.04

## ANALGESIC ACTIVITY OF DERMORPHIN AND ITS PROLINE ANALOGS

L. S. Guzevatykh<sup>1</sup>, D. V. Valuiskikh<sup>1</sup>, T. A. Voronina<sup>1</sup>, T. G. Emel'yanova<sup>2</sup>, L. A. Andreeva<sup>3</sup>, L. Yu. Alfeeva<sup>3</sup>, S. B. Seredenin<sup>1</sup>, and N. F. Myasoedov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Psychopharmacology, Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

<sup>2</sup> Laboratory of Structural Organization of Biological systems, Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 117334 Russia

<sup>3</sup> Department of Regulatory Peptides, Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

Dermorphin (Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>; DM) and its analogs obtained via stereochemical transformation of L-Pro<sup>6</sup> to D-Pro<sup>6</sup> peptide in DM ([Dpro<sup>6</sup>]DM) and via dehydration of L-Pro<sup>6</sup> peptide ([dHPro<sup>6</sup>]DM) were characterized with respect to the analgesic activity in rats tested under conditions corresponding to various levels of pain sensitivity organization. The drugs were introduced by intraperitoneal injections in various doses (0.1, 1.0, and 10 mg/kg). In the case of acetic-acid induced convulsions (writhing), DM and [Dpro<sup>6</sup>]DM produced analgesic action in the minimum dose, while the analogous effect of [dHPro<sup>6</sup>]DM was observed only in greater doses. In the tail-clamp (Haffner) test, DM and [Dpro<sup>6</sup>]DM also inhibited nociception while the latter compound was ineffective. In the grid-shock test, [Dpro<sup>6</sup>]DM showed a higher activity than [dHPro<sup>6</sup>]DM, whereas DM did not produce analgesic action. Thus, all the studied peptides exhibit pronounced analgesic activity, and the replacement of L-Pro<sup>6</sup> in DM by its stereomer D-Pro is more effective than the substitution of dHPro<sup>6</sup>.