

DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-3-12-14

АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДА ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩЕГОСЯ С ПУРИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ (P2X3)

Ю. А. Паликова¹, Т. Ю. Жармухамедова^{1, 3}, В. А. Паликов¹,
О. Н. Хохлова^{1, 2}, Г. А. Осипова¹, Я. А. Андреев^{4, 5}, Ю. А. Логашина^{4, 5},
С. А. Козлов⁴, А. Н. Яворский^{3, 6}, А. Н. Мурашев^{1, 2, 3}, И. А. Дьяченко^{1, 2, 3}

Представлены результаты исследования обезболивающей активности рекомбинантного природного пептида РТ1, специфически связывающегося с P2X3-рецепторами. В тесте гиперчувствительности, спровоцированной полным адьювантом Фрейнда, показана выраженная обезболивающая активность пептида РТ1 на мышцах CD-1 после однократного внутривенного введения в диапазоне доз от 0,01 до 1 мг/кг.

Ключевые слова: P2X3; природные пептиды; *in vivo* модели; обезболивающая активность; мышцы.

ВВЕДЕНИЕ

Ионотропные пуриновые рецепторы (P2X) являются лиганд-управляемыми ионными каналами, активируемыми внеклеточным аденозинтрифосфатом (АТФ), некоторыми другими нуклеотидами и их производными. P2X-рецепторы широко распространены в теле человека. Так, они характерны для периферических нейронов, иннервирующих различные органы и ткани [8]. Потенциальная важность этих мишеней для разработки фармакологических веществ обусловлена повсеместным присутствием их эндогенного лиганда АТФ в организме. Предполагается участие P2X рецепторов в болевой чувствительности, связанной с травмами, опухолями, воспалением, мигренью, респираторными заболеваниями. У человека известно 7 изоформ P2X-рецепторов, среди которых изоформы P2X2, P2X3, P2X4 и P2X7, как полагают, участвуют в системе восприятия боли [6]. P2X3-рецепторы являются важными и хорошо изученными “участниками” болевых процессов как в центральной, так и периферической нервной системе, что позволяет рассматривать их как перспективную мишень

в лечении болевых состояний, а их антагонисты — как потенциальные анальгетические средства [9].

Из яда паука *Geolycosa sp* хроматографическим методом был выделен пептид (РТ1), состоящий из 35 аминокислотных остатков. РТ1 имеет следующую аминокислотную последовательность: Gly¹-Tyr²-Cys³-Ala⁴-Glu⁵-Lys⁶-Gly⁷-Ile⁸-Arg⁹-Cys¹⁰-Asp¹¹-Asp¹²-Ile¹³-His¹⁴-Cys¹⁵-Cys¹⁶-Thr¹⁷-Gly¹⁸-Leu¹⁹-Lys²⁰-Cys²¹-Lys²²-Cys²³-Asn²⁴-Ala²⁵-Ser²⁶-Gly²⁷-Tyr²⁸-Asn²⁹-Cys³⁰-Val³¹-Cys³²-Arg³³-Lys³⁴-Lys³⁵. Измеренная моноизотопная молекулярная масса природного РТ1 составляет 3833,5 Да [1]. Для исследования пептид был получен генно-инженерным методом. РТ1 способен избирательно ингибировать токи, опосредованные пуриновыми рецепторами P2X3 в сенсорных нейронах крыс, а также в условиях экспрессии генов P2X3 рецепторов человека в клетках НЕК 293. Показано, что при действии наномолярных концентраций пептида значительно уменьшается активирующий эффект природного агониста АТФ, что связано, по-видимому, со стабилизацией десенситизированного состояния рецепторов. Концентрация РТ1, вызывающая 50 % ингибирование токов, опосредованных P2X3-рецепторами в сенсорных нейронах крыс, (IC₅₀) составляет (12 ± 2) нМ при коэффициенте Хилла (nH) (1,1 ± 0,2), для RO-85 IC₅₀ в отношении рекомбинантных рецепторов крыс составляет ~ 31 нМ. Исследования активности РТ1 в отношении ряда ионных каналов и ионотропных рецепторов подтверждают специфичность действия пептида на P2X3-рецепторы [4].

В настоящее время известен ряд компонентов природных ядов, которые оказывают обезболивающее действие, многие из них находятся на стадии клинических или доклинических исследований. Сходным механизмом действия обладают препараты на основе конотоксина. Практическое применение находит, например, ω-конотоксин MVIIA (Зиконотид, “Приалт” — действует как блокатор нейронспецифических кальциевых каналов N-типа) [5]. Введение таких препаратов, как приалт,

¹ ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Российская Академия наук, Россия, 142290, г. Пущино, Московская область, Проспект науки д. 6; e-mail: yuliyapalikova@bibch.ru

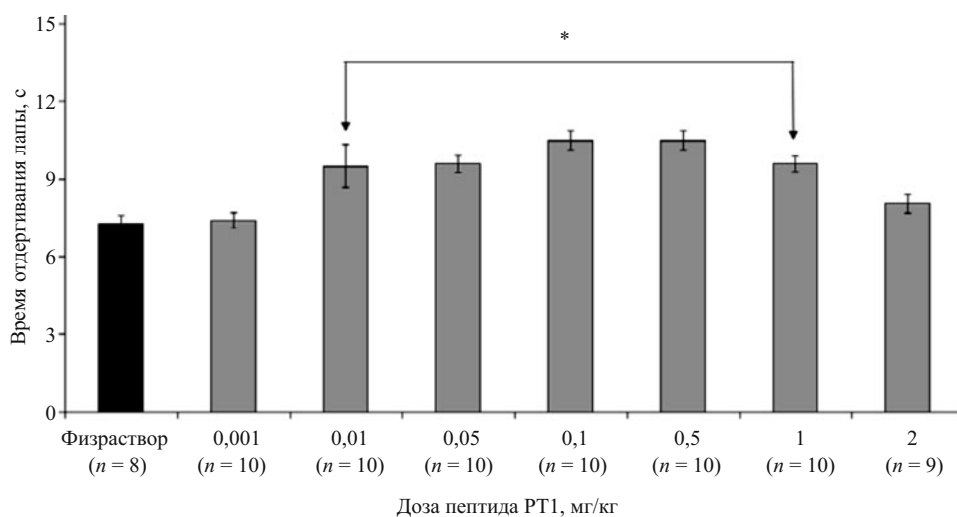
² ФГБУН Пушчинский научный центр, Российская Академия Наук, Россия, 142290, г. Пущино, Московская область, Проспект науки д. 3.

³ ФГБУН Пушчинский государственный естественно-научный институт, Россия, 142290, г. Пущино, Московская область, Проспект науки д. 3.

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 России, Институт молекулярной медицины, Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8.

⁶ ФГБУ “Научный центр экспертизы средств медицинского применения” Минздрава России, Россия, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8.



Время нахождения на термостатируемой поверхности (с) в исследовании обезболивающей активности пептида PT1 после однократного внутривенного введения мышам CD-1 на биомодели термической гиперчувствительности, спровоцированной CFA.

Примечание: данные представлены как среднее арифметическое \pm ошибка среднего арифметического; n — количество животных в группе. * $p < 0,05$ статистический анализ проводился с использованием теста ANOVA-1 (Duncan test) относительно контрольной группы (физиологический раствор).

проводится посредством спинномозговой инъекции, что во многих случаях трудновыполнимо и требует применения специального медицинского оборудования (например, имплантированных насосов) и работы высококвалифицированного персонала. Известны некоторые низкомолекулярные антагонисты P2X3 рецепторов, например, 2',3'-O-(2,4,6-тринитрофенил) — АТФ, аналоги сурамина, спинорфин, производные диаминопиримидина, а также пиперазина и фенилтиенопиразола. Недостатками указанных веществ являются: существование других мишеней, помимо пуриновых рецепторов; большинство обладают недостаточной избирательностью в отношении гомомерных P2X3-рецепторов [3].

Цель исследования — изучение обезболивающей активности пептида PT1, специфически взаимодействующего с P2X3 рецептором.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения обезболивающей активности пептида PT1 был выбран тест тепловой гиперчувствительности, спровоцированной CFA (Complete Freund's Adjuvant) [2], в котором немаловажный вклад в восприятие боли вносят P2X3-рецепторы [9].

Исследование проводили на мышах CD-1 в возрасте 8–10 недель. Животные были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» Филиала Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН и имели статус SPF (specific pathogen free), подтверждаемый сертификатом производителя. Все процедуры по рутинному уходу за животными выполняли в соответствии с ГОСТ 33216-2014, ГОСТ 33217-2014.

Животных содержали в комнате барьерного типа в контролируемых условиях окружающей среды (20–24 °C и 28–63 % относительная влажность). Темпера-

тура и влажность постоянно контролировались в экспериментальной комнате с помощью системы мониторинга EVL. В комнате содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения и, по крайней мере, 10-кратная смена объема воздуха комнаты в час.

Пептид PT1 исследовали на биомодели термической гиперчувствительности, спровоцированной CFA. Протокол исследования направлен на оценку анальгетической активности после развития воспалительного процесса. В заднюю лапу мышей тест-системы субплантарно вводили 20 мкл смеси CFA/0,9 % NaCl (1:1, v:v). Через 21–24 ч после введения CFA экспериментальным животным вводили PT1, контрольным животным — физиологический раствор. Исследуемый пептид вводили внутривенно в дозах: 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2 мг/кг мышам CD-1. Через 15 мин проводили испытание порога болевой чувствительности на установке «Hot plate» ($t = 53$ °C), контролируя только конечность, в которую вводили CFA. Отмечали время отдергивания лапы (ВОЛ).

Для всех количественных данных применена описательная статистика, подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего (SEM). Статистический анализ проводили с использованием теста ANOVA-1 (Duncan test) относительно контрольной группы. Изменение исследуемых показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБХ, идентификатор соглашения RFMEFI62117X0018.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования представлены на рисунке. Исследуемый пептид в дозе 0,001 мг/кг ВОЛ = (7,4 \pm 0,3) с достоверных отличий от контрольной группы не показал. Внутривенное введение PT1 в диапазоне доз от 0,01 мг/кг ВОЛ = (9,5 \pm 0,8) с до 1 мг/кг

ВОЛ = $(9,6 \pm 0,3)$ с достоверно увеличивало время нахождения на термостабируемой поверхности экспериментальных животных относительно контрольной группы, получавшей физиологический раствор, ВОЛ = $(7,3 \pm 0,3)$ с ($p < 0,05$).

В диапазоне доз 0,01 – 0,1 мг/кг РТ1 не вызывал достоверных различий ВОЛ. Однако максимальная активность наблюдалась в дозах 0,1 мг/кг (~ 44 %) и 0,5 мг/кг (~ 44 %) относительно контрольной группы.

Дальнейшее увеличение дозы РТ1 до 2 мг/кг ($8,1 \pm 0,4$) с не выявило достоверных отличий от контрольной группы и стало нецелесообразным для изучения обезболивающей активности.

В результате проведенного исследования показано, что РТ1 проявляет значительную обезболивающую активность в тесте гиперчувствительности, спровоцированной СФА в дозах 0,1 и 0,5 мг/кг при тестировании на 15 мин после введения пептида. Следовательно, пептид РТ1 является перспективным соединением для создания на его основе анальгетических веществ нового поколения.

В настоящее время на мембране ноцицепторов идентифицированы различные рецепторы, в том числе АТФ (P2X) [7]. Ноцицепторы могут быть активированы сильным механическим (укол, щипок, удар), термическим (нагревание, охлаждение) или химическим (действие альгогенов — брадикинин, гистамин, вещество Р, простагландины и др.) стимулами. На поверхности ноцицепторов экспрессируются множество каналов и рецепторов. Биомодель гиперчувствительности, спровоцированной СФА, вызывает выраженное визуальное изменение лапы, в которую вводили раствор адьюванта Фрейнда. Формирование отека и является причиной активации ноцицепторов, в том числе и P2X. Поскольку

исследуемый пептид РТ1 показал специфическое взаимодействие с P2X3-рецепторами [4], можно предположить, что формирование обезболивающей активности РТ1 опосредовано через рецептор P2X3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, пептид РТ1 в дозах от 0,01 до 1 мг/кг при однократном внутривенном введении мышам CD-1 в тесте гиперчувствительности, спровоцированной полным адьювантом Фрейнда, продемонстрировал анальгезирующую активность: достоверно увеличивал время нахождения на термостабируемой поверхности экспериментальных животных относительно контрольной группы, получавшей физиологический раствор в среднем на 30 – 44 % ($p < 0,05$).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-24-00118).

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Василевский, Г. А. Савченко, Ю. В. Королькова и др., Патент № RU 2 422 459 C1 (2011).
2. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, А. Н. Миронов (ред), Москва (2012).
3. D. S. Carter, et al., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, **19**, 1628 – 1631 (2009).
4. E. V. Grishin, G. A. Savchenko, A. A. Vassilevski, et al., *Ann. Neurol.*, **67**, 680 – 683 (2010).
5. R. J. Dark, et al., *J. Biol. Chem.*, **281**, 23254 – 23263 (2006).
6. D. Donnelly-Roberts, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **324**, 409 – 415 (2008).
7. S. Hunskaar, K. Hole, *Pain.*, **30**(1), 103 – 114 (1987).
8. A. Surprenant, R. A. Annu, *Rev. Physiol.*, **71**(3), 333 – 359 (2009).
9. K. Wirkner, et al., *Mol. Neurobiol.*, **36**, 165 – 183 (2007).

Поступила 22.12.17

ANALGESIC ACTIVITY OF A NATURAL PEPTIDE CAPABLE OF SPECIFIC BINDING TO PURINERGIC (P2X3) RECEPTORS

Yu. A. Palikova^{1*}, T. Yu. Zharmukhamedova^{1,3}, V. A. Palikov¹, O. N. Khokhlova^{1,2}, G. A. Osipova¹, Ya. A. Andreev^{4,5}, Yu. A. Logashina^{4,5}, S. A. Kozlov⁴, A. N. Yavorskii^{3,6}, A. N. Murashev^{1,2,3}, and I. A. D'yachenko^{1,2,3}

¹ Pushchino Branch of the Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Prospekt Nauki 6, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

² Pushchino Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Prospekt Nauki 3, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

³ Pushchino State Natural-Sciences Institute, Prospekt Nauki, 3, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

⁴ Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

⁵ Institute of Molecular Medicine, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, ul. Trubetskaya 8, Moscow, 119991 Russia

⁶ Scientific Center for Expert Evaluation of Medical Products, Russian Federation Ministry of Health, Petrovsky bul. 8, Moscow, 127051 Russia

* e-mail: yuliyapalikova@bibch.ru

Results of investigation of the analgesic activity of the natural recombinant peptide PT1, which specifically binds to P2X3 receptors, are presented. The test for hypersensitivity provoked by complete Freund's adjuvant (CFA) showed evidence of the analgesic activity of PT1 peptide in CD-1 mice after single intravenous administration in a dose range of 0.01 – 1 mg/kg.

Keywords: P2X3 receptors; natural peptides; *in vivo* hypersensitivity model; analgesic activity; mice.