

УДК 612.822.3

## МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ МОДУЛЯЦИИ ТРИПЕПТИДОМ ВОЗБУДИМОСТИ МЕМБРАНЫ НОЦИЦЕПТИВНОГО НЕЙРОНА

© 2016 г. Т. Н. Шелых, И. В. Рогачевский, академик РАН А. Д. Ноздрачев,  
О. С. Веселкина, С. А. Подзорова, Б. В. Крылов, В. Б. Плахова

Поступило 08.10.2015 г.

С помощью метода локальной фиксации потенциала в конфигурации регистрации активности “целая клетка” исследовали способность аргининсодержащих трипептидов Ac-RER-NH<sub>2</sub>, Ac-RR-NH<sub>2</sub> и свободной молекулы Arg модулировать возбудимость мембраны ноцицепторов. Внеклеточный Ac-RER-NH<sub>2</sub> при взаимодействии с наружной мембраной ноцицептивного нейрона вызывает снижение величины  $Z_{\text{eff}}$  активационной воротной системы каналов Na<sub>v</sub>1.8. Таким образом, трипептид Ac-RER-NH<sub>2</sub> можно рассматривать в качестве нового эффективного и безопасного анальгетика.

DOI: 10.7868/S0869565216060232

Обнаружение медленных натриевых каналов позволило по-новому подойти к исследованию механизмов ноцицепции [1, 2]. Эти каналы, связываясь с мембранными рецепторами, могут образовывать на мембране нейрона своеобразное рецептивное поле, примером чего служит направленная модуляция Na<sub>v</sub>1.8-каналов, отвечающих за кодирование болевого сигнала в ноцицептивных нейронах, рецепторов серотонина [3] и опиоидоподобных рецепторов [4]. Активация опиоидоподобных рецепторов производным гамма-пирона (коеновая кислота) позволяет, не вызывая негативных побочных эффектов, избирательно выключить только высокочастотную компоненту импульсной активности, специфически кодирующую ноцицептивный сигнал мембраны сенсорного нейрона [5].

Перспективными фармакологическими субстанциями, активирующими указанный механизм мембранной сигнализации, могут быть вещества пептидной и непептидной природы. Одно из производных гамма-пирона — коеновая кислота — было предложено нами в качестве действующей субстанции нового отечественного неопиоидного анальгетика “Аноцептин” [5], успешно прошедшего первую фазу клинических испытаний, что позволило нам накопить уникальный опыт разработки совершенно новых эффективных анальгетиков.

Другое направление наших исследований связано с разработкой пептидных анальгетиков на основе молекул дефенсинов кролика. Как было показано ранее [6–9], внеклеточное взаимодействие эндогенных антибиотиков дефенсина NP-1 ( $K_d = 2$  пмоль/л) и дефенсина NP-4 ( $K_d = 80$  нмоль/л) с наружной мембраной нейронов спинальных ганглиев крыс приводит к снижению эффективного заряда активационной воротной системы медленных натриевых каналов Na<sub>v</sub>1.8 ( $Z_{\text{eff}}$ ), что свидетельствует о способности указанных молекул модулировать потенциалочувствительность этих каналов. Поскольку молекулы исследованных нами дефенсинов кролика состоят из 33 аминокислотных остатков и обладают сложной структурой, были предприняты попытки выделить фрагменты этих молекул в виде коротких пептидов, которые были бы относительно легко синтезируемы, но в то же время сохраняли бы необходимый спектр физиологически важных свойств в первую очередь анальгетического действия. Было установлено, что синтетические гексапептиды Ac-PRERRA-NH<sub>2</sub>, Ac-PRARRA-NH<sub>2</sub> и Ac-PKEKKA-NH<sub>2</sub> (последовательность PRERRA является фрагментом нативной формы молекулы дефенсина NP-1) в эндогенных концентрациях (100 нмоль/л) снижают потенциалочувствительность Na<sub>v</sub>1.8-каналов [10].

Поскольку замена Glu на Ala (переход от Ac-PRERRA-NH<sub>2</sub> к Ac-PRARRA-NH<sub>2</sub>) мало повлияла на модулирующие свойства пептида [10], можно сделать вывод, что наличие в атакующей молекуле аминокислотного остатка Glu не является необходимым условием, определяющим способность пептида к связыванию с каналом, что рас-

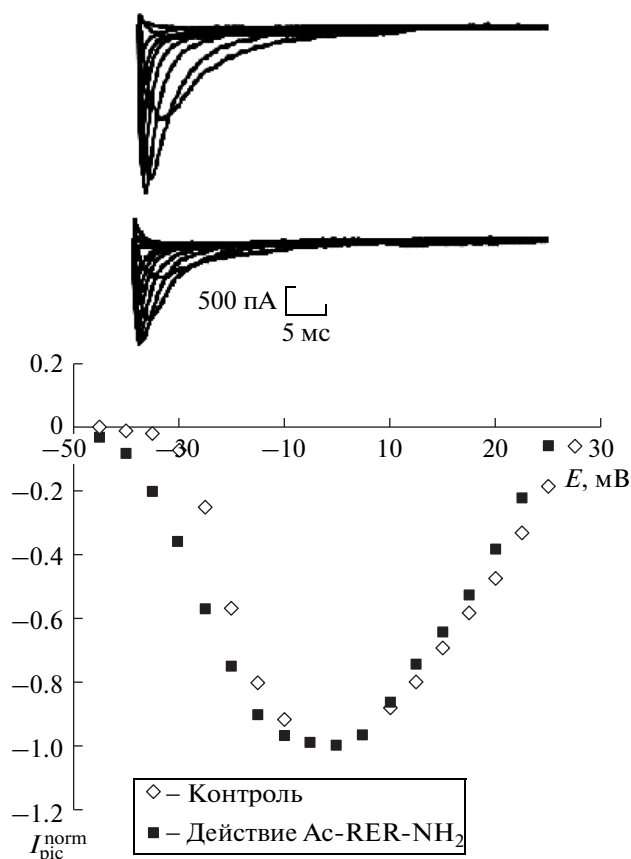
Институт физиологии им. И.П. Павлова  
Российской Академии наук, Санкт-Петербург  
E-mail: shelt76@mail.ru

ходится с нашими более ранними представлениями [7]. С другой стороны, сохранение наблюдаемого эффекта при переходе от Ac-PRERRA-NH<sub>2</sub> к Ac-PKEKKA-NH<sub>2</sub> указывает на то, что в формировании лиганд-рецепторного комплекса участвует положительно заряженная функциональная группа. Arg и Lys несут положительный заряд в боковой цепи при физиологически адекватных условиях, и наличие у молекулы Ac-PKEKKA-NH<sub>2</sub> достоверно определенной способности снижать  $Z_{\text{eff}}$  говорит о потенциальной взаимозаменяемости Arg и Lys в процессе связывания гексапептидов по механизму модулированного рецептора [11] с молекулярной мишенью, являющейся частью аминокислотной последовательности Na<sub>v</sub>1.8-канала [10].

Очевидно, что ключевую роль в механизме лиганд-рецепторного связывания молекулы Ac-PRERRA-NH<sub>2</sub> играет аминокислотный остаток Arg. Важной задачей является поиск максимально короткого пептида, содержащего остаток указанной аминокислоты и способного снижать потенциалочувствительность Na<sub>v</sub>1.8-каналов. Подобный пептид, вероятно, сможет обладать теми же, что и коеновая кислота, анальгетическими свойствами, но благодаря своей эндогенной природе может быть более безопасен и эффективен. Для его разработки необходимо было детально исследовать механизмы действия аргининсодержащих пептидов на мембрану ноцицептивного нейрона, что и составило предмет настоящего исследования.

С помощью метода локальной фиксации потенциала в конфигурации регистрации активности "целая клетка" исследовали способность молекул Ac-RER-NH<sub>2</sub>, Ac-RR-NH<sub>2</sub> и свободной молекулы Arg модулировать возбудимость мембраны ноцицепторов – снижать потенциалочувствительность медленных натриевых каналов Na<sub>v</sub>1.8, ответственных за кодирование болевых сигналов.

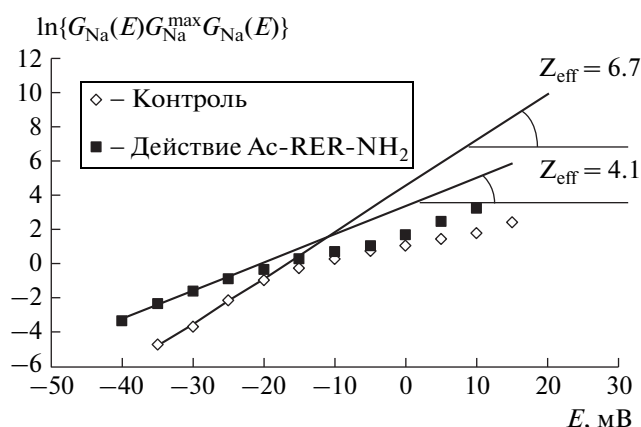
Опыты проводили с использованием стандартных растворов [12] на культивируемых изолированных сенсорных нейронах, выделенных из областей L<sub>5</sub>–S<sub>1</sub> ганглиев спинного мозга новорожденных крысят популяции Wistar. Культивирование изолированных нейронов в течение двух часов в стандартных питательных средах в атмосфере 95% CO<sub>2</sub> позволяет получить интактные клетки [12, 13], мембрана которых сохраняет свои ноцицептивные физиологические характеристики. Пептиды получали методом классического пептидного синтеза, для чего использовали реактивы и производные аминокислот фирм "Sigma Chemical Co." (США), "Iris Biotech GmbH" (Германия), растворители производства компаний "Экос-1" и "Криохром" (Россия). Конечный продукт характеризовали с помощью аналитической ВЭЖХ (чистота > 95%) и масс-спектрометрии. Статистическую обработку полученных результа-



**Рис. 1.** Нормированные значения пиковых вольтамперных характеристик натриевых каналов Na<sub>v</sub>1.8, построенные по данным контрольного эксперимента и после добавления во внеклеточный раствор 1 мкмоль/л трипептида Ac-RER-NH<sub>2</sub>. Справа вверху – кривые медленных Na<sub>v</sub>1.8-токов, полученных в контрольных экспериментах и после действия трипептида Ac-RER-NH<sub>2</sub> в концентрации 1 мкмоль/л. Диапазон тестирующего потенциала от –60 до 45 мВ, шаг 10 мВ. Во всех записях поддерживаемый потенциал, длительность которого составляла 500 мс, был равен 110 мВ. Вычитание токов утечки и ёмкостных токов – программным способом.

тов проводили с помощью критерия *t* Стьюдента. Достоверными считали различия при  $p \leq 0.05$ .

Действие молекулы Ac-RER-NH<sub>2</sub> в концентрации 1 мкмоль/л на наружную поверхность плазматической мембраны нейрона приводило к изменению эффективного заряда ( $Z_{\text{eff}}$ ) активационной воротной системы каналов Na<sub>v</sub>1.8 (рис. 1, 2). Именно этот параметр является показателем, определяющим эффект воздействия исследуемых агентов. Уменьшение  $Z_{\text{eff}}$  приводит к снижению частоты повторных ответов мембраны ноцицептивного нейрона, что, в свою очередь, ведет к купированию болевых сигналов [5, 12]. Величину  $Z_{\text{eff}}$  количественно оценивали обычным способом [12]. При подаче на мембрану последовательности ступенек напряжения (*E*) регистрировали ампли-



**Рис. 2.** Влияние трипептида Ac-RER-NH<sub>2</sub> на величину эффективного заряда активационной воротной системы медленных натриевых каналов. Экспоненциальная функция, представленная в логарифмическом масштабе (ось ординат), позволяет определить величину  $Z_{\text{eff}}$  по тангенсу угла наклона асимптот, проведенных к начальным участкам этих функций в контрольном опыте и после добавления во внеклеточный раствор трипептида Ac-RER-NH<sub>2</sub> в концентрации 1 мкмоль/л.

тудные (пиковые) значения токов ( $I_{\text{max}}$ ), которые могут быть выражены в виде функции  $I_{\text{max}}(E)$ . На рис. 1 эта зависимость представлена как нормированная функция. Далее, применение метода Алмуса [5, 12] позволяет с удовлетворительной точностью получить оценку величины эффективного заряда активационного воротного устройства медленных натриевых каналов (рис. 2).

Основным результатом нашей работы явилось выяснение минимальной эффективной длины аминокислотной последовательности аргинин-содержащих пептидов. Нами было обнаружено, что снижение величины  $Z_{\text{eff}}$  происходит при действии трипептида Ac-RER-NH<sub>2</sub>, тогда как дипептид Ac-RR-NH<sub>2</sub> и свободная молекула Arg подобным эффектом не обладали (табл. 1).

Полную оптимизацию геометрических параметров изолированных молекул трипептида Ac-

**Таблица 1.** Количественная оценка влияния исследуемых субстанций на эффективный заряд медленных натриевых каналов

Вещество	Концентрация, мкмоль/л	$Z_{\text{eff}}$ , ( $\bar{X} \pm SD$ )	Количество опытов
Контроль		$6.6 \pm 0.3$	24
Ac-RER-NH <sub>2</sub>	1	$4.6 \pm 0.4^*$	14
Ac-RR-NH <sub>2</sub>	1	$6.2 \pm 0.4$	14
Arg	1	$6.3 \pm 0.3$	12

\* –  $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

RER-NH<sub>2</sub> и дипептида Ac-RR-NH<sub>2</sub> осуществляли полуэмпирическим методом РМЗ, а также ограниченным методом Хартри–Фока ab initio с применением базиса 6-31G\* [14] по программе GAMESS [15]. Квантовохимические расчеты показали, что молекула трипептида стабилизирована образованием солевого мостика между гуанидиновой группой боковой цепи Arg1 и карбоксильной группой боковой цепи Glu2, а также трех внутримолекулярных водородных связей: водородной связи между атомом азота гуанидиновой группы Arg3 и атомом карбонильного кислорода амидированного С-конца молекулы пептида. Наличие этих взаимодействий заметно ограничивает конформационную подвижность молекулы.

Основной вклад в энергию связывания трипептида Ac-RER-NH<sub>2</sub> с каналом, вероятно, вносит формирование межмолекулярной ион-ионной связи с участием гуанидиновой группы остатка Arg3 и нуклеофильного центра в составе модулированного рецептора. В пользу данного предположения свидетельствует стерическая доступность гуанидинового фрагмента Arg3, а также тот факт, что ионизованные функциональные группы боковых цепей Arg1 и Glu2 образуют между собой солевую связь, которая должна быть разорвана для того, чтобы указанные группы могли вступать в эффективное взаимодействие с рецептором. Функция аминокислотного остатка Glu2, видимо, заключается в стабилизации действующей конформации молекулы трипептида за счет образования внутримолекулярной ионной связи.

В молекуле дипептида Ac-RR-NH<sub>2</sub> также присутствуют два стерически доступных положительно заряженных гуанидиновых фрагмента, однако данная молекула не способна снижать величину  $Z_{\text{eff}}$ , равно как и свободная молекула Arg.

Наиболее вероятное объяснение отсутствию наблюдаемого эффекта у молекул Arg и Ac-RR-NH<sub>2</sub> заключается в том, что только энергии образования межмолекулярной ион-ионной лиганд-рецепторной связи недостаточно для активации процесса связывания лиганда с рецептором, приводящего к снижению  $Z_{\text{eff}}$ . В полную энергию формирования лиганд-рецепторного комплекса могут вносить вклад ван-дер-ваальсовы взаимодействия, а также образование межмолекулярных водородных связей. Молекула Ac-RR-NH<sub>2</sub> обладает вытянутой формой из-за электростатического отталкивания гуанидиновых фрагментов, несущих заряд одного знака, в то время как молекула Ac-RER-NH<sub>2</sub> более компактна за счет наличия стабилизирующих внутримолекулярных взаимодействий и имеет форму, близкую к эллипсоидной, что делает данную молекулу более комплементарной своему сайту связывания.

Таким образом, самым коротким пептидом, способным проявить потенциальные анальгетические свойства, является трипептид Ас-RER-NH<sub>2</sub>. Однако при этом его действующая концентрация оказывается в 10 раз выше, чем у гексапептида Ас-PRERRA-NH<sub>2</sub>, включающего в себя последовательность RER, и на 6 порядков выше, чем у молекулы NP-1.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что взаимодействие молекулы Ас-RER-NH<sub>2</sub> с мембраной ноцицептивного нейрона вызывает такой же эффект снижения величины Z<sub>эф</sub> активационной воротной системы каналов Na<sub>v</sub>1.8, что и таковое коеновой кислоты, являющейся действующей субстанцией разработанного нами высокоэффективного и безопасного неопиоидного анальгетика непептидной природы “Аноцептина”. Еще одной общей чертой Ас-RER-NH<sub>2</sub> и “Аноцептина” является наличие у них электрофильного центра, участвующего в образовании межмолекулярной ион-ионной связи, которая вносит основной вклад в энергию формирования лиганд-рецепторного комплекса: в молекуле Ас-RER-NH<sub>2</sub> – это гуанидиновая группа боковой цепи Arg, в молекуле коеновой кислоты – хелатированный атом Ca<sup>2+</sup>, поскольку данная молекула связывается с рецептором в форме соли хелатного комплекса с Ca<sup>2+</sup> [5]. Тем самым молекулу Ас-RER-NH<sub>2</sub> можно считать возможным новым анальгетиком эндогенной природы.

Работа поддержана грантом РФФ № 14–15–00677.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kostyuk P.G., Veselovsky N.S., Tsyndrenko A.Y. Ionic Currents in the Somatic Membrane of Rat Dorsal Root Ganglion Neurons // *Neuroscience*. 1981. V. 6. № 12. P. 2423–2430.
2. Kostyuk E.P., Kostyuk P.G., Voitenko N.V. Structural and Functional Characteristics of Nociceptive Pathways and Their Alterations // *Neurophysiology*. 2001. V. 33. № 2. P. 303–313.
3. Cardenas C.G., Dei Mar L.P., Cooper B.Y., Scroggs R.S. 5HT<sub>4</sub> Receptors Couple Positively to Tetrodotoxin-Insensitive Sodium Channels in a Subpopulation of Capsaicin-Sensitive Rat Sensory Neurons // *J. Neurosci*. 1997. V. 17. № 19. P. 7181–7189.
4. Крылов Б.В., Дербенев А.В., Подзорова С.А., Людьюно М.И., Кузьмин А.В., Изварина Н.Л. Морфин уменьшает чувствительность к потенциалу медленных натриевых каналов // *Рос. физиол. журн.* 1999. Т. 85. № 2. С. 225–236.
5. Plakhova V.B., Rogachevsky I.V., Lopatina E.V., Shelykh T.N., Butkevich I.P., Mikhaienko V.A., Otellin V.A., Podzorova S.A., Krylov B.V. A Novel Mechanism of Modulation of Slow Sodium Channels: from Ligand-Receptor Interaction to Design of an Analgesic Medicine // *Activitas Nervosa Superior Rediviva*. 2014. V. 56. № 3/4. P. 55–64.
6. Ноздрачев А.Д., Крылов Б.В., Сабанов В.С., Подзорова С.А., Плахова В.Б., Шамова О.В., Орлов Д.С., Кокряков В.Н. Эндогенные антибиотики дефенсины как возможные регуляторы функционирования натриевых каналов нейронов спинномозговых ганглиев // *ДАН*. 1997. Т. 355. № 5. С. 705–707.
7. Плахова В.Б., Шеголев Б.Ф., Рогачевский И.В., Ноздрачев А.Д., Крылов Б.В., Подзорова С.А., Кокряков В.Н. Возможный молекулярный механизм взаимодействия дефенсина с мембраной сенсорного нейрона // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2000. Т. 86. № 11. С. 1471–1480.
8. Рогачевский И.В., Плахова В.Б., Шеголев Б.Ф., Ноздрачев А.Д., Крылов Б.В., Подзорова С.А., Кокряков В.Н. Рецептор дефенсина: возможный механизм снижения возбудимости мембраны сенсорного нейрона // *ДАН*. 2000. Т. 375. № 6. С. 843–846.
9. Плахова В.Б., Рогачевский И.В., Шеголев Б.Ф., МакКи М.Л., Кокряков В.Н., Алешина Г.М., Подзорова С.А., Ноздрачев А.Д., Карымова Е.А., Крылов Б.В. Дефенсин NP-4 уменьшает потенциалочувствительность медленных натриевых каналов сенсорных нейронов // *Сенсор. системы*. 2005. Т. 19. № 2. С. 110–116.
10. Плахова В.Б., Рогачевский И.В., Шелых Т.Н., Подзорова С.А., Крылов Б.В. Возможный молекулярный механизм анальгетического эффекта пептидных фрагментов дефенсинов // *Мед. акад. журн.* 2013. Т. 13. № 3. С. 78–83.
11. Можяева Г.Н., Наумов А.П., Носырева Е.Д. Кинетика спада натриевого тока при реполяризации аксональной мембраны в норме и в присутствии токсина скорпиона // *Нейрофизиология*. 1980. Т. 12. № 5. С. 541–549.
12. Yachnev I.L., Plakhova V.B., Podzorova S.A., Shelykh T.N., Rogachevsky I.V., Krylov B.V. Mechanism of Pain Relief by Low-Power Infrared Irradiation: ATP is an IR-Target Molecule in Nociceptive Neurons // *Med. Chem*. 2012. V. 8. № 1. P. 14–21.
13. Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. Effect of Internal Fluoride and Phosphate on Membrane Currents during Intracellular Dialysis of Nerve Cells // *Nature*. 1975. V. 257. № 5528. P. 691–693.
14. Hariharan P.C., Pople J.A. The Influence of Polarization Functions on Molecular Orbital Hydrogenation Energies // *Theor. Chim. Acta*. 1973. V. 28. № 3. P. 213–222.
15. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A., Elbert S.T., Gordon M.S., Jensen J.H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K.A., Su S., Windus T.L., Dupuis M., Montgomery J.A. General Atomic and Molecular Electronic Structure System // *J. Comput. Chem*. 1993. V. 14. № 11. P. 1347–1363.