

Изучение эффективности природных лигандов протоноактивируемых рецепторов на биомодели соматической боли

И.А. Дьяченко^{1,2}, В.А. Паликов¹, Ю.А. Паликова¹, Г.И. Белоус¹,
Е.А. Калабина¹, Е.С. Садовникова¹, Е.А. Рассказова¹, И.Н. Кравченко¹,
Т.Ю. Жармухамедова¹, А.Н. Мурашев^{1,2}

¹ – Филиал ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пуцинский государственный естественно-научный институт, г. Пуцино Московской области

² – ФГБУН Пуцинский научный центр РАН, г. Пуцино Московской области

Контактная информация: к.б.н. Дьяченко Игорь Александрович, dyachenko@bibch.ru

С помощью биомоделей для оценки соматической боли («гиперчувствительность, спровоцированная CFA» и «висцеральные боли») изучили природные лиганды протоноактивируемых рецепторов. Пептид UGTX, введенный внутримышечно, в исследовании фармакологической активности в тестах «Гиперчувствительность, спровоцированная CFA», и «Висцеральные боли» показал максимальную обезболивающую активность в дозе 0,02 мг/кг. Влияние увеличения или уменьшения дозы пептида UGTX достоверно не отличалось от препарата сравнения. Новый компонент Севанол, выделенный из укуснокислого экстракта тимьяна, в дозе 1 мг/кг показал сопоставимую с диклофенаком обезболивающую активность, однако в дозе 10 мг/кг достоверно превосходил диклофенак по показателю «снижение общего количества корч». Изучаемые лиганды могут быть рассмотрены как потенциальные обезболивающие лекарственные препараты.

Ключевые слова: ASICs, природные лиганды, *in vivo* модели, анальгетическая активность.

Введение

Неприятные болевые ощущения и, в первую очередь, хронические болевые синдромы значительно снижают качество жизни людей. Они часто вызывают физические и эмоциональные страдания, сопровождающиеся депрессией, подавленным настроением и чувством безнадежности.

Современные стратегии поиска новых потенциальных анальгетиков вызывают с изменением чувствительности ноцицепторов (воздействие на семейство каналов переменного рецепторного потенциала (TRP) и др. каналы

ноцицепторов), нормализацией состояния ноцицепторов, нарушенного при воспалении (блокада активности медиаторов и модуляторов, изменяющих порог активности ноцицепторов), снижением патологической возбудимости нейронов, участвующих в проведении ноцицептивного сигнала (блокаторы тетродотоксин нечувствительных Na⁺-каналов, блокаторы Ca²⁺-каналов). Новые соединения с обезболивающей активностью могут быть найдены среди ингибиторов ЦОГ-3, блокаторов протончувствительных каналов ASIC3, каналов пуриновых рецепторов P2X2 и P2X3,

блокаторов рецепторов брадикинина, кальцитонин-ген-родственного пептида (КГРП), каннабиноидов [2].

Детальные механизмы возникновения патологических болей до конца не выяснены, но известен ряд клеточных рецепторов, отвечающих за восприятие болевых стимулов и генерацию болевых ощущений. По современным представлениям, одними из важнейших рецепторов болевого каскада являются кислото-чувствительные ионные каналы (ASICs) [4]. Ионные каналы ответственны за восприятие снижения рН в тканях (ацидоз), которое может происходить как в норме (при накоплении молочной кислоты, в связи с усилением анаэробного метаболизма глюкозы, и высвобождении протонов при гидролизе АТФ), так и при патологии (воспалительные процессы в тканях, ишемический инсульт, черепно-мозговая травма, опухоли, повреждение тканей и эпилептический припадок) [3].

Каналы ASICs относятся к надсемейству амилорид-чувствительных дегенерин/эпителиальных (DEG/ENaC) Na^+ -каналов и представлены в организме в виде шести изоформ: ASIC1a, -1b, -2a, -2b, -3 и -4. Они в большом количестве встречаются в нейронах ЦНС, где было обнаружено, по крайней мере, три (ASIC1a, ASIC2a и ASIC2b) из шести субъединиц. Из всех субъединиц, представленных в мозге, ASIC1a является основной. Показано, что ASIC1a и ASIC2 принимают непосредственное участие в процессах синаптической пластичности, обучении, передаче нервного возбуждения, ишемических процессах, эпилепсии, кислотоопосредованного нейронального повреждения [12].

В нейронах периферической нервной системы в основном представлены гомо-

мерные ASIC3 и гетеромерные ASIC3-содержащие каналы. Способность этих каналов воспринимать сигналы в виде небольшого снижения рН внеклеточной среды (до значений 7,0-6,7), интегрировать различные воспалительные и ишемические стимулы (такие, как АТФ, молочная и арахидоновая кислоты, повышение осмотического давления) позволяет рассматривать ASIC3 в качестве основных участников процесса развития боли. Характерной особенностью при активации ASIC3 является их способность проводить токи двух видов: быстрые, инактивирующиеся в течение нескольких мс, и медленные, продолжительностью в несколько десятков сек. Для периферических ASIC3-каналов было показано, что они:

а) участвуют в восприятии кислотоопосредованной, воспалительной и постоперационной боли;

б) вносят вклад в развитие первичной и/или вторичной механогиперчувствительности в мышцах;

в) участвуют в кожной и висцеральной механочувствительности и восприятии боли от механических стимулов;

г) участвуют в восприятии болевых сигналов от легких и ЖКТ [11].

Поиск природных веществ, проявляющих активность по отношению к каналу ASIC3, проводился среди животных (морские анемоны) и растительных организмов. Для этого либо получали образцы ядов морских анемонов, либо подготавливали экстракты из растительного материала. Полученные таким образом образцы тестировали на наличие искомой биологической активности.

Мы идентифицировали новый компонент, выделенный из кислотного (уксуснокислого) экстракта тимьяна (*Thymus*

armeniacus), который называли «Севанол» (или 9,10-диизоцитриловый эфир эпифилловой кислоты). Севанол является первым природным низкомолекулярным соединением, ингибирующим обе компоненты тока канала ASIC3, и проявляет ингибирующее действие рН-индуцированных токов ASIC3-рецепторов. Пиковая компонента тока ингибируется полностью ($IC_{50}=353$ мкМ), в то время как продолжительная компонента – только на 45% (IC_{50} около 234 ± 53 мкМ). При этом он также ингибирует проводимость экспрессированных в ооцитах лягушки ASIC1a, хотя и менее эффективно [6]. Севанол – первое природное соединение, которое оказывает эффект ингибирования как на переходных, так и на выдержанных составляющих тока ASIC3.

Принципиально отличный по структуре полипептид Ugr 9-1 (UGTX) получен из яда морской анемоны *Urticina grebelnyi*. Его молекулярная масса – 3135 Да, и он является самым коротким полипептидом, способным модулировать активность ASIC. Пространственная структура UGTX представляет собой β -шпильку и пять β -поворотов, стабилизированные двумя дисульфидными связями, в то время как длинный N-концевой и короткий C-концевой участки выдаются из плотной центральной области β -структуры. Пептид UGTX обладает ингибирующим действием на пиковую и продолжительную компоненты тока ASIC3, не оказывая эффекта на остальные изоформы кислоточувствительных каналов [8]. Это отличает биологические свойства UGTX от др. токсинов морских анемонов – APETx2 и Hcr 1b-1, которые ингибируют только пиковую компоненту тока [7]. Пиковая компонента ингибировалась при добавлении токсина

полностью ($IC_{50}=10$ мкМ), а продолжительная компонента – только на 48% ($IC_{50}=1,44$ мкМ) [10].

В экспериментах на животных с использованием неспецифических блокаторов, таких, как амилорид, НПВС и A-317567 [7], в т.ч. на мышах, нокаутных по гену ACCN3 [5], кодирующему ASIC3, была продемонстрирована ключевая роль ASICs и, особенно, ASIC3-канала, в генерации высокоинтенсивных болевых стимулов – таких, как кислотоиндуцированная кожная боль и развитие гиперчувствительности к механическим стимулам при воспалительном процессе в мышцах.

Цель исследования – изучение обезболивающей активности новых лигандов, специфически взаимодействующих с ASIC-рецептором.

Материалы и методы

Для изучения обезболивающей активности двух новых лигандов ASIC3 (Севанола и пептида UGTX) были выбраны тесты тепловой гиперчувствительности, спровоцированной введением полного адьюванта Фрейнда (CFA), и кислотной стимуляции боли («висцеральные боли»), в которых немаловажный вклад в восприятие боли вносят ASIC3-каналы [1, 9].

Исследование проводилось 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, подтвержденный сертификатом производителя. Все процедуры по рутинному уходу за животными вы-

полнялись в соответствии с СОП лаборатории.

Животные содержались в комнате барьерного типа при температуре воздуха 20-24°C и относительной влажности 28-63%. Температура 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.

Результаты и их обсуждение

Введение Севанола в дозе 1 мг/кг в тесте «Гиперчувствительность, спровоцированная CFA» увеличивало время нахождения на термостатируемой поверхности примерно на 41% относительно контрольной группы,

получавшей физ. р-р. В дозе 10 мг/кг обезболивающий эффект увеличился относительно контрольной группы до ~67%. Достоверных отличий между дозами не наблюдали. Пептид UGTX в диапазоне доз от 0,01 мг/кг (15%) до 0,5 мг/кг (76%) показал выраженный доза-эффект исследуемого пептида относительно контрольной группы. Достоверных отличий между дозами 0,1 мг/кг (60%) и 0,5 мг/кг (76%) не наблюдали (рис. 1).

Дальнейшие исследования обезболивающей активности проводили с помощью теста «Висцеральные боли» (спровоцированные внутрибрюшинным введением уксусной кислоты 0,6%). Наблюдение за животными проводили в течение 15 мин после введения раздражителя. Введение Севанола в дозе 0,01 г/кг достоверно снижало общее

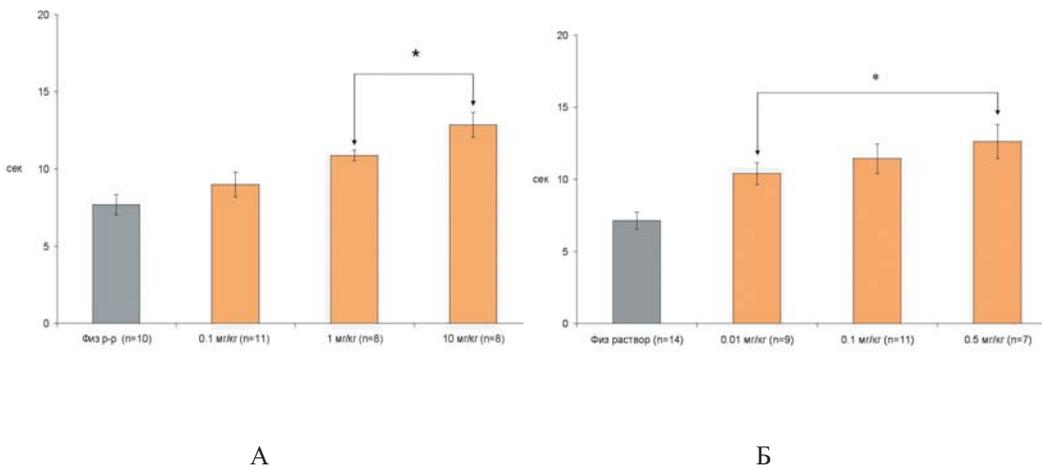


Рис. 1. Время нахождения на термостатируемой поверхности (сек) в биомодели термической гиперчувствительности, спровоцированной CFA. Внутривенное введение полипептида Севанол (А) и пептида UGTX (Б) мышам CD-1 с последующим тестированием через 30 мин.

Данные представлены как средняя арифметическая \pm ошибка средней арифметической.

Примечание: n – количество животных в группе, * – $p < 0,05$ (статистический анализ проводился с использованием теста ANOVA-1 (Duncan test) относительно контрольной группы (физ. р-р)).

количество корчей на 44% после введения раздражителя, пептид UGTX в дозе 0,01 мг/кг снижал общее количество корчей лишь на 24%, в обоих случаях полученные результаты достоверно отличались от контрольной группы, получавшей физ. р-р. Дальнейшее увеличение дозы пептида UGTX лишь незначительно повышало обезболивающую активность: 0,1 мг/кг – 35%, 0,5 мг/кг – 45% относительно контрольной группы. В группе, получавшей Севанол в дозе 0,1 мг/кг (66%), наблюдали достоверно большую активность относительно дозы 0,01 мг/кг. Дальнейшее увеличение дозы до 1 мг/кг (67%) достоверно отличалось от предыдущей дозы 0,1 мг/кг, однако не отличалось от дозы 10 мг/кг (75%), результаты исследования представлены на рис. 2.

Таким образом, по результатам проведенного исследования Севанола и пептида UGTX после внутривенного введения в тестах «Гиперчувствительность, спровоцированная CFA» и «Висцеральные боли» показано, что для Севанола максимальная обезболивающая активность наблюдается в дозе 1 мг/кг,

для пептида UGTX – 0,1 мг/кг. Обезболивающая активность Севанола и пептида UGTX в указанных тестах после внутримышечного введения оказалась более высокой. Поскольку в исследовании использовался внутримышечный способ введения, дополнительно была создана группа, которой вводили препарат сравнения (диклофенак) в дозе 1 мг/кг внутримышечно. В тесте гиперчувствительности, спровоцированной CFA, диклофенак на 81% увеличивал время нахождения на термостабируемой поверхности относительно контрольной группы. Было показано, что для самого распространенного НПВС данный тест является специфичным и показывает максимальную обезболивающую активность. В исследовании висцеральной боли диклофенак показал обезболивающую активность и достоверно снижал общее количество корчей на 57% относительно контроля.

Внутримышечное введение Севанола в дозе 0,1 мг/кг увеличивало обезболивающую активность на 38% относительно контрольной группы и на 24% – относительно диклофенака. В дан-

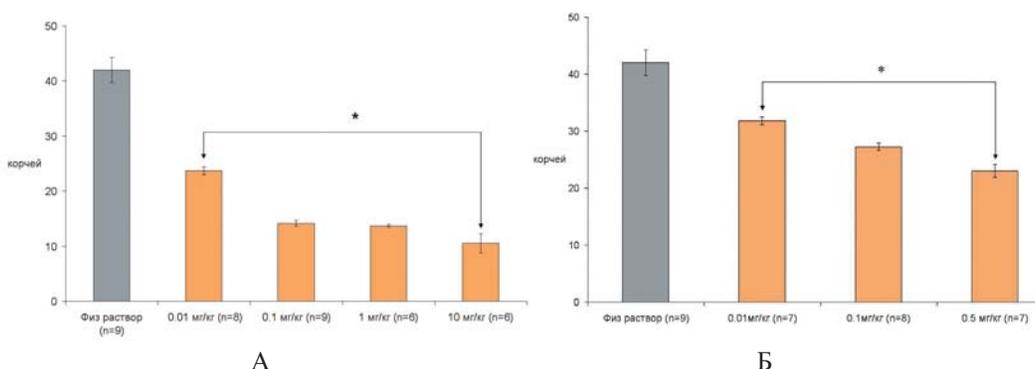


Рис. 2. Общее количество судорог мышеч CD-1 в тесте висцеральной боли. Все обозначения – как на рис. 1.

ной дозе Севанол не отличался как от контрольной группы, так и от препарата сравнения. Дальнейшее увеличение дозы до 1 мг/кг достоверно увеличило время нахождения на термостатируемой поверхности на 84% относительно контрольной группы, однако эти результаты были сопоставимы с группой, получавшей диклофенак. Дальнейшее увеличение дозы до 10 мг/кг на 94% увеличило обезболивающую активность относительно контрольной группы, но достоверно не отличалось от дозы 1 мг/кг и эффекта диклофенака. Полученные результаты показали, что Севанол обладает максимальной обезболивающей активностью в тесте гиперчувствительности, спровоцированной СФА, в диапазоне доз 1-10 мг/кг.

Аналогичные результаты были показаны в тесте «Висцеральные боли» после введения раздражителя: эффект Севанола (0,001 мг/кг) достоверно отличался от контрольной группы, общее количество корчей снижалось на 19%. Увеличение дозы до 0,1 мг/кг снижало общее количество корчей на 42% относительно контрольной группы, а относительно диклофенака – было больше на 33%. В дозе 1 мг/кг была обнаружена сопоставимая с диклофенаком обезболивающая активность, проявляющаяся в снижении общего количества корчей. Увеличение дозы до 10 мг/кг показало, что общее количество корчей достоверно снижается относительно диклофенака на 45% и на 76% – относительно контрольной группы.

Таким образом, по результатам проведенного исследования было показано, что Севанол в дозе 1 мг/кг обладает сопоставимой с диклофенаком обезболивающей активностью, однако в дозе

10 мг/кг достоверно превосходит диклофенак по показателю снижения общего количества корчей.

Эффект внутримышечного введения пептида UGTX в дозах 0,002 и 1 мг/кг в тесте «Гиперчувствительность, спровоцированная СФА» достоверно не отличался от контроля. Экспериментальные животные также проводили на термостатируемой поверхности достоверно меньше времени относительно диклофенака. В дозе 0,02 мг/кг обнаружено достоверное повышение этого показателя на 159% относительно контрольной группы и на 43% – относительно диклофенака. Доза 0,02 мг/кг является «включающей» обезболивающую активность UGTX, однако последующее увеличение дозы не влияет на данный показатель. В расчете результатов наблюдается высокая вариабельность: некоторые экспериментальные животные не достаточно хорошо отвечали на обезболивающую активность, что указывает на избирательный эффект.

Исследование фармакологической активности пептида UGTX в тесте висцеральной боли оценивали через 2 ч после внутримышечного введения. Максимальная фармакологическая активность, достоверно отличающаяся от контрольной группы (74%) и эффектов диклофенака (40%), наблюдалась в дозе 0,02 мг/кг. Дальнейшее увеличение дозы до 0,2 мг/кг недостоверно уменьшало общее количество корчей на 16% относительно диклофенака, однако достоверно отличалось от контрольной группы (на 64%). Увеличение дозы до 1 мг/кг достоверно не отличалось от диклофенака, результаты были сопоставимы с дозой 0,2 мг/кг.

Пептид UGTX в исследовании фармакологической активности после внутримышечного введения в тестах «Гиперчувствительность, спровоцированная СФА» и «Висцеральные боли» показал максимальную обезболивающую активность в дозе 0,02 мг/кг. Однако при увеличении или уменьшении дозы пептида UGTX его эффекты достоверно не отличались от таковых препарата сравнения.

Заключение

По результатам проведенного исследования обезболивающей активности полипептида Севанол и пептида UGTX показаны их обезболивающие эффекты в тестах «Гиперчувствительность, спровоцированная СФА» и «Висцеральные боли». Полученные лиганды могут быть рассмотрены как потенциальные обезболивающие лекарственные препараты.

Список литературы

1. *Бондаренко Д.А., Дьяченко И.А., Скобцов Д.И., Мурашев А.Н.* In vivo модели для изучения анальгетической активности // Биомедицина. 2011. № 2. С. 84-94.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. - М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
3. *Яшин В.И., Веденин А.Н., Яшин А.Я.* Антиоксиданты и спорт. Основные причины неудачных применений, возможные перспективы // Спортивная медицина: наука и практика. 2016. № 1. С. 35-39.
4. *Deval E., Noël J., Gasull X., Delaunay A., Alloui A., Friend V., Eschalièr A., Lazdunski M., Lingueglia E.* Acid-sensing ion channels in postoperative pain // J. Neurosci. 2011. No. 31. P. 6059-6066.
5. *Dubé G.R., Lehto S.G., Breese N.M., Baker S.J., Wang X., Matulenko M.A., Honoré P., Stewart A.O., Moreland R.B., Brioni J.D.*

Electrophysiological and in vivo characterization of A-317567, a novel blocker of acid sensing ion channels // Pain. 2005. No. 117(1-2). P. 88-96.

6. *Dubinyi M.A., Osmakov D.I., Koshelev S.G., Kozlov S.A., Andreev Y.A., Zakaryan N.A., Dyachenko I.A., Bondarenko D.A., Arseniev A.S., Grishin E.V.* Lignan from thyme possesses inhibitory effect on ASIC3 channel current // J. Biol. Chem. 2012. No. 287. P. 32993-33000.
7. *Gautam M.I., Benson C.J., Ranier J.D., Light A.R., Sluka K.A.* ASICs do not play a role in maintaining hyperalgesia induced by repeated intramuscular acid injections // Pain Res. Treat. 2012:817347. doi: 10.1155/2012/817347.
8. *Karczewski J., Spencer R.H., Garsky V.M., Liang A., Leitl M.D., Cato M.J., Cook S.P., Kane S., Urban M.O.* Reversal of acid-induced and inflammatory pain by the selective ASIC3 inhibitor, APETx2 // Br. J. Pharmacol. 2010. No. 161. P. 950-960.
9. *Mogil J.S., Breese N.M., Witty M.F., Ritchie J., Rainville M.L., Ase A., Abbadi N., Stucky C.L., Séguéla P.* Transgenic expression of a dominant-negative ASIC3 subunit leads to increased sensitivity to mechanical and inflammatory stimuli // J. Neurosci. 2005. No. 26;25(43). P. 9893-901.
10. *Osmakov D.I., Kozlov S.A., Andreev Y.A., Koshelev S.G., Sanamyan N.P., Sanamyan K.E., Dyachenko I.A., Bondarenko D.A., Murashev A.N., Mineev K.S., et al.* Sea anemone peptide with uncommon β -hairpin structure inhibits acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic activity // J. Biol. Chem. 2013. No. 288. P. 23116-23127.
11. *Sluka K.A., Winter O.C., Wemmie J.A.* Acid-sensing ion channels: A new target for pain and CNS diseases // Curr. opin. drug discov. devel. 2009. No. 12. P. 693-704.
12. *Wemmie J.A., Askwith C.C., Lamani E., Caspell M.D., Freeman J.H., Welsh M.J.* Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning // J. Neurosci. 2003. No. 23. P. 5496-5502.

Study the efficiency of a natural ligand of a protono-activated receptors on biomodels of somatic pain

I.A. Dyachenko, V.A. Palikov, Yu.A. Palikova, G.I. Belous, E.A. Kalabina,
E.S. Sadovnikova, E.A. Rasskazova, I.N. Kravchenko,
T.Yu. Zharmukhamedova, A.N. Murashev

Natural ligands protono-activated receptors were studied by biomodel (hypersensitivity provoked by CFA and visceral pain) assessment of somatic pain. Peptide UGTX study pharmacological activity after intramuscular hypersensitivity tests provoked CFA, and visceral pain, showed the maximum analgesic activity at a dose of 0.02 mg / kg. Increasing or decreasing the dose of UGTX peptide was not significantly different from the reference drug. Sevanol 1 mg / kg showed comparable diclofenac analgesic activity, but at a dose of 10 mg / kg of diclofenac significantly superior in terms of reduction of the total number of cramps. The studied ligands may be considered as potential analgesic drugs.

Key words: ASICs, natural ligands, *in vivo* models, analgesic activity.