

**Юлия Владимировна Кожевникова**

Младший научный сотрудник лаборатории молекулярной фармакологии и биомедицины Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. В 2022 г. с отличием окончила Дальневосточный федеральный университет (Институт Мирового океана) по направлению «Биологические системы ДВО РАН».

Объектом изучения молодого ученого являются пептиды, обнаруженные в яде морских анемонов, которые проявляют анальгетическую и противовоспалительную активность за счет ингибирования ионных каналов семейства TRP.

Юлия Владимировна является финалистом конференции «Наука будущего – наука молодых» (Новосибирск, 2022 г.), где выступила с постерным докладом. Результаты научных работ представлены на Региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по естественным наукам (Владивосток, 2017, 2020, 2021 гг.). Имеет публикации в материалах ряда конференций ДВФУ.

Научная статья

УДК 577.112

DOI: 10.37102/0869-7698_2023_228_02_12

EDN: XPFUNV

Исследование анальгетической и противовоспалительной активности HCRG21, пептида морской анемоны *Heteractis crispa*, содержащего мутацию S5L

Ю.В. Кожевникова[✉], А.А. Климович

Юлия Владимировна Кожевникова

младший научный сотрудник

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,

Владивосток, Россия

Yliya77ya@mail.ru

Анна Анатольевна Климович

кандидат биологических наук

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,

Владивосток, Россия

annaklim_1991@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4477-4203>

Аннотация. Проведена сравнительная оценка анальгетической и противовоспалительной активности пептида HCRG21 и его мутантного аналога HCRG21 S5L в капсаициновом тесте и в тесте АИТС-индуцируемого ноцицептивного поведения *in vivo*. Выявлено, что пептид HCRG21 S5L, в отличие от пептида HCRG21, оказывал меньший анальгетический эффект и не проявлял противовоспалительной активности в тесте АИТС-индуцируемого ноцицептивного поведения.

Ключевые слова: пептиды морских анемонов, *Heteractis crispa*, TRPV1, TRPA1, анальгезия, воспаление

Для цитирования: Кожевникова Ю.В., Климович А.А. Исследование анальгетической и противовоспалительной активности HCRG21, пептида морской анемоны *Heteractis crispa*, содержащего мутацию S5L // Вестн. ДВО РАН. 2023. № 2. С. 144–149. http://dx.doi.org/10.37102/0869-7698_2023_228_02_12.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-74-20088.

Original article

Study of analgesic and anti-inflammatory activity of HCRG21, a peptide of the sea anemone *Heteractis crispa*, containing S5L mutation

Yu.V. Kozhevnikova, A.A. Klimovich

Julia V. Kozhevnikova

Junior Researcher

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia
Yliya77ya@mail.ru

Anna A. Klimovich

Candidate of Sciences in Biology

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia
annaklim_1991@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4477-4203>

Abstract. The analgesic and anti-inflammatory activities of the HCRG21 peptide and its mutant analog HCRG21 S5L in the capsaicin test and in the AITC-induced nociceptive behavior model *in vivo* were comparatively evaluated. Unlike HCRG21, the HCRG21 S5L peptide was found to have less analgesic effect and exhibit no anti-inflammatory activity in the AITC-induced nociceptive behavior test.

Keywords: sea anemone peptides, *Heteractis crispa*, TRPV1, TRPA1, analgesia, inflammation

For citation: Kozhevnikova Yu.V., Klimovich A.A. Study of analgesic and anti-inflammatory activity of HCRG21, a peptide of the sea anemone *Heteractis crispa*, containing S5L mutation. *Vestnik of the FEB RAS*. 2023;(2):144-149. (In Russ.). https://10.37102/0869-7698_2023_228_02_12.

Funding. This work was supported by Grant No. 19-74-20088 of the Russian Science Foundation.

Введение

Катионные каналы суперсемейства TRP (Transient receptor potential) – одни из важнейших интеграторов болевых (тепловых, химических и т.д.) и воспалительных стимулов, поэтому рассматриваются в качестве терапевтической мишени при лечении большого числа различных патологий, особенно болевых синдромов и воспалений [1]. Одной из актуальных задач биохимии и биомедицины является поиск соединений, способных ингибировать активность TRP каналов и, следовательно, купировать боль. В настоящее время антагонисты TRP рассматриваются как достойная замена традиционным анальгетическим средствам [2].

Пептид Кунитц-типа, HCRG21, продуцируемый морской анемоной *Heteractis crispa*, является блокатором TRPV1 канала [3], участвующим в передаче болевого импульса. Эффективность HCRG21 была оценена на различных болевых и воспалительных моделях *in vivo*. Показано, что при внутримышечном введении в дозах 0,1–1 мг/кг HCRG21 проявляет ярко выраженную анальгетическую активность на модели «горячая пластина» [4]. Исследование фармакодинамики эффективности HCRG21 показало, что анальгетическое действие пептида начинает проявляться через 1 ч после введения и сохраняется в течение 13 ч. На модели острого локального воспаления, вызванного введением каррагинана, продемонстрировано, что в дозах 0,1–1 мг/кг при внутривенном введении HCRG21 способствует уменьшению объема воспалительного отека лапы мыши и снижению уровня фактора некроза опухоли α (провоспалительного медиатора, играющего ведущую роль в развитии воспалительных процессов), а также снижению гипералгезии, которое наблюдается до 24 ч [5].

Для выяснения роли отдельных аминокислотных остатков, определяющих биологический эффект пептидных молекул, обычно используют их аналоги, содержащие замены остатков в функционально важных участках последовательности. Так, было показано, что замена остатка серина на лейцин в 5-м положении последовательности HCRG21 привела к изменению его функциональных свойств. Методом двухфазной фиксации потенциала на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих потенциал-зависимые калиевые каналы (Kv), было определено, что HCRG21 S5L обладает свойствами слабого блокатора изоформ Kv1.1, Kv1.2 и Kv1.3 [6], в то время как HCRG21 был совершенно неактивен в отношении Kv1.x [3]. Однако влияние этой точечной мутации на блокирующую активность HCRG21 в отношении TRPV1 не изучено.

Материалы и методы

В данной работе на *in vivo* моделях боли, индуцированных капсаицином и аллилизотиоцианатом (АИТС) – прямыми агонистами каналов TRPV1 и TRPA1, проведена сравнительная оценка эффективности пептида HCRG21 и его мутантного аналога HCRG21 S5L.

Пептиды HCRG21 и HCRG21 S5L были получены в результате экспрессии их генов в бактериях *Escherichia coli*, выделения и очистки методом ОФ ВЭЖХ, как описано ранее [3, 6]. Исследования были выполнены на белых мышах – самцах линии CD-1 возрастом 10 недель, массой 30 ± 2 г. Перед началом работы животные в течение двух недель были акклиматизированы и содержались в пластиковых клетках в стандартных контролируемых условиях при температуре 22 ± 2 °С, влажности 50 % и 12-часовом световом цикле. Животные имели постоянный доступ к сбалансированному корму для лабораторных животных и воде в соответствии с российским протоколом ГОСТ Р 50258-92. Все основные манипуляции с мышами проводились с 9:00 до 15:00. Эксперименты с животными проводились в соответствии с руководством ARRIVE и с европейскими директивами 86/609/ЕЕС, 2010/63/EU, а также согласно национальному стандарту РФ Р 53434-2009 и одобрены

этическим комитетом Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН.

В капсаициновом тесте пептиды HCRG21 и HCRG21S5L вводили животным в дозах 1,0 и 0,1 мг/кг внутримышечно (в четырехглавую мышцу левого бедра) за 60 мин до тестирования. Контрольной группе животных вводили равный объем физраствора. После введения индуктора фиксировали следующие параметры: латентное время начала реакции животного на индукцию боли (первое облизывание или подергивание поврежденной лапы), количество облизываний (типичная реакция грызунов на болевой стимул) и продолжительность облизывания поврежденной лапы. Анальгетический эффект пептидов оценивали по снижению чувствительности животных к раздражающему действию капсаицина, что выражалось в уменьшении интенсивности и времени облизывания раздраженной лапы.

В тесте АИТС-индуцируемого ноцицептивного поведения пептиды HCRG21 и HCRG21 S5L вводили животным внутримышечно в дозе 1 мг/кг за 60 мин до тестирования. Контрольной группе животных вводили равный объем физраствора. Фиксировали следующие параметры: латентное время начала реакции животного на индукцию боли, продолжительность облизывания и поджатия поврежденной лапы. Анальгетический эффект пептидов оценивали по снижению чувствительности животных к раздражающему действию АИТС, что выражалось в уменьшении интенсивности и времени облизывания и поджатия раздраженной лапы. Противовоспалительное действие пептидов было оценено по их влиянию на динамику изменения воспалительного отека, вызванного АИТС. Для этого с помощью плейтезмометра измеряли диаметр поврежденной лапы перед началом эксперимента, после инъекции исследуемых веществ и через 2, 4 и 24 ч после введения АИТС.

Объем воспалительного отека рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Объем отека лапы, \%} = V_k - V_i / V_k \times 100,$$

где V_k – объем лапы после введения АИТС, V_i – объем лапы до введения АИТС.

Результаты и обсуждение

В результате показано, что HCRG21 в дозе 1 мг/кг уменьшал количество облизываний поврежденной капсаицином лапы более чем в 2,5 раза, время облизывания – приблизительно в 5 раз, в дозе 0,1 мг/кг HCRG21 снижал количество облизываний в 2 раза, время облизывания – более чем в 3,5 раза (рис. 1). Кроме того, HCRG21 в исследуемых дозах приблизительно в 2 раза повышал время первой реакции, т.е. препятствовал проведению болевого сигнала от ноцицептивных рецепторов в ЦНС. Анальгетическое действие пептида HCRG21 S5L было значительно слабее, чем у HCRG21: в дозе 1 мг/кг он в 1,5 раза снижал количество и время облизывания поврежденной лапы и в 2 раза повышал латентное время начала реакции на болевой стимул.

Также при наблюдении за поведением мышей после болевой стимуляции отмечено, что в группах HCRG21 и HCRG21 S5L животные в меньшей степени проявляли видимые типичные признаки боли и стресса, такие как подергивание и поджатие лапы, хромая походка, дрожание, сгорбленная поза, опущенная голова, нежелание передвигаться и наступать на поврежденную лапу. Данный факт говорит о значительном снижении болевой чувствительности животных под действием пептидов в активных дозах.

На модели АИТС-индуцируемого ноцицептивного поведения было показано, что HCRG21 снижал более чем в 2 раза время облизывания и в 6,5 раз – время поджатия поврежденной лапы, а также уменьшал болевую чувствительность, что выражалось в увеличении латентного времени начала реакции животного на индукцию боли (рис. 2). Кроме того, HCRG21 практически полностью ингибировал развитие воспалительной реакции,

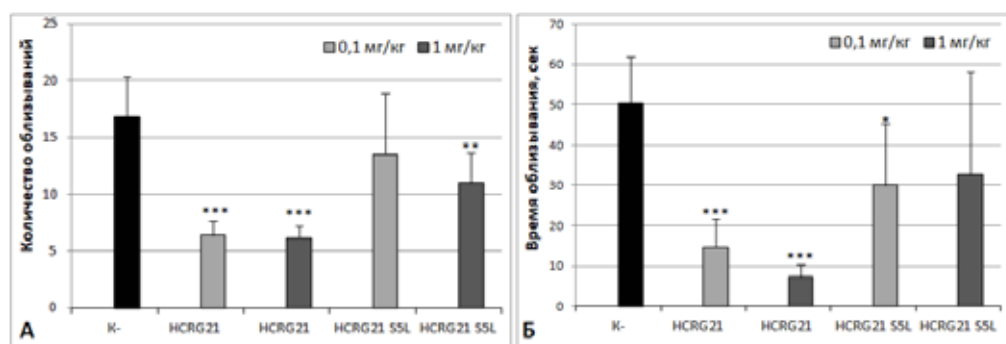


Рис. 1. Показатели ноцицептивного ответа у экспериментальных животных после введения капсаицина: количество облизываний (А), продолжительность облизывания (Б) поврежденной лапы и латентное время начала реакции на боль (В). Результаты представлены как MEAN ± SD при n = 7. Достоверные отличия представлены относительно контрольной группы (К-) по t-критерию Стьюдента при *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001

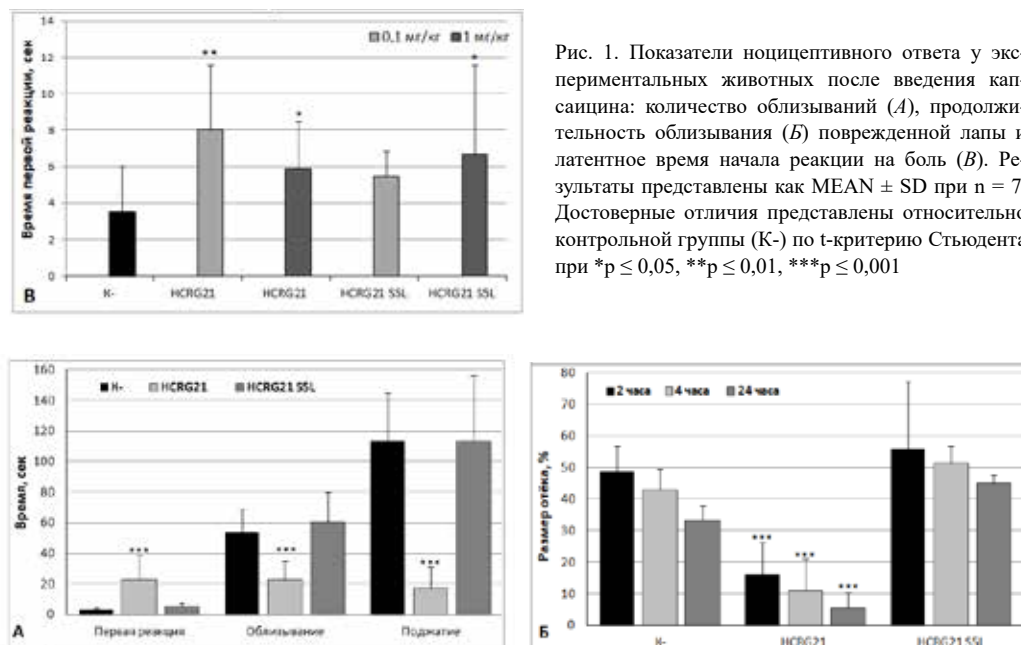


Рис. 2. Показатели АИТС-индуцированного ноцицептивного ответа у экспериментальных животных: латентное время начала реакции, продолжительность облизывания и поджатия поврежденной лапы (А); динамика изменения АИТС-индуцированного воспалительного отека лапы у мышей (Б). Результаты представлены как MEAN ± SD при n = 7. Достоверные отличия представлены относительно контрольной группы (К-) по t-критерию Стьюдента при ***p ≤ 0,001

индуцированной АИТС. В группе животных, пролеченных HCRG21, объем поврежденной лапы практически не менялся на протяжении всего эксперимента.

В отличие от HCRG21 пептид HCRG21 S5L не оказывал какого-либо влияния на измеряемые параметры. Следовательно, на данной модели достоверного обезболивающего или противовоспалительного действия HCRG21 S5L не проявлял, что, вероятно, говорит об отсутствии его влияния на активность TRPA1.

Заключение

Таким образом, замена всего одной аминокислоты в последовательности HCRG21 привела к значительному уменьшению его эффективности в моделях боли и воспаления *in vivo*. Следовательно, наличие остатка серина в 5-м положении имеет важное значение для проявления его анальгетического и противовоспалительного действия.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Carnevale V., Rohacs T. TRPV1: A target for rational drug design // *Pharmaceuticals*. 2016. Vol. 9, N 3. P. 1–20.
2. Gladkikh I., Peigneur S., Sintsova O., Lopes Pinheiro-Junior E., Klimovich A., Menshov A., Kalinovsky A., Isaeva M., Monastyrnaya M., Kozlovskaya E., Jan Tytgat, Leychenko E. Kunitz-type peptides from the sea anemone *Heteractis crispa* demonstrate potassium channel blocking and anti-inflammatory activities // *Biomedicines*. 2020. Vol. 8, N 11. P. 473–490.
3. Maatuf Y., Geron M., Priel A. The Role of Toxins in the Pursuit for Novel Analgesics // *Toxins*. 2019. Vol. 11, N 2. P. 1–34.
4. Monastyrnaya M., Peigneur S., Zelepuga E., Sintsova O., Gladkikh I., Leychenko E., Isaeva M., Tytgat J., Kozlovskaya E. Kunitz-type peptide HCRG21 from the sea anemone *Heteractis crispa* is a full antagonist of the TRPV1 receptor // *Mar. Drugs*. 2016. Vol. 14, N 12. P. 229–249.
5. Sintsova O., Gladkikh I., Klimovich A., Palikova Yu., Palikov V., Styshova O., Monastyrnaya M., Dyachenko I., Kozlov S., Leychenko E. TRPV1 blocker HCRG21 suppresses TNF- α production and prevents the development of edema and hypersensitivity in carrageenan-induced acute local inflammation // *Biomedicines*. 2021. Vol. 9, N 7. P. 716–727.
6. Синцова О.В., Паликов В.А., Паликова Ю.А., Климович А.А., Гладких И.Н., Андреев Я.А., Моностыр-ная М.М., Козловская Э.П., Дьяченко И.А., Козлов С.А., Лейченко Е.В. Пептидный блокатор ионного канала TRPV1 проявляет длительный анальгетический эффект в модели тепловой стимуляции // *Докл. Российской академии наук. Науки о жизни*. 2020. Т. 493. С. 423–426.

REFERENCES

1. Carnevale V., Rohacs T. TRPV1: A target for rational drug design. *Pharmaceuticals*. 2016;9(3):1-20.
2. Gladkikh I., Peigneur S., Sintsova O., Lopes Pinheiro-Junior E., Klimovich A., Menshov A., Kalinovsky A., Isaeva M., Monastyrnaya M., Kozlovskaya E., Jan Tytgat, Leychenko E. Kunitz-type peptides from the sea anemone *Heteractis crispa* demonstrate potassium channel blocking and anti-inflammatory activities. *Biomedicines*. 2020;8(11):473-490.
3. Maatuf Y., Geron M., Priel A. The role of toxins in the pursuit for novel analgesics. *Toxins*. 2019;11(2):1-34.
4. Monastyrnaya M., Peigneur S., Zelepuga E., Sintsova O., Gladkikh I., Leychenko E., Isaeva M., Tytgat J., Kozlovskaya E. Kunitz-type peptide HCRG21 from the sea anemone *Heteractis crispa* is a full antagonist of the TRPV1 receptor. *Mar. Drugs*. 2016;14(12):229-249.
5. Sintsova O., Gladkikh I., Klimovich A., Palikova Yu., Palikov V., Styshova O., Monastyrnaya M., Dyachenko I., Kozlov S., Leychenko E. TRPV1 blocker HCRG21 suppresses TNF- α production and prevents the development of edema and hypersensitivity in carrageenan-induced acute local inflammation. *Biomedicines*. 2021;9(7):716-727.
6. Sintsova O.V., Palikov V.A., Palikova Yu.A., Klimovich A.A., Gladkikh I.N., Andreev Y.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P., Diachenko I.A., Kozlov S.A., Leychenko E.V. A peptide blocker of the TRPV1 ion channel exhibits a prolonged analgesic effect in a model of thermal stimulation. *Papers of the Russian Academy of Sciences. Life Sciences*. 2020;493:423-426. (In Russ.).

