

**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<sup>✉</sup>, А.А. Климович

*Юлия Владимировна Кожевникова*

младший научный сотрудник

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

Владивосток, Россия

[Yliya77ya@mail.ru](mailto: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](mailto: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](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](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  $\alpha$  (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  $30 \pm 2$  г. Перед началом работы животные в течение двух недель были акклиматизированы и содержались в пластиковых клетках в стандартных контролируемых условиях при температуре  $22 \pm 2$  °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,

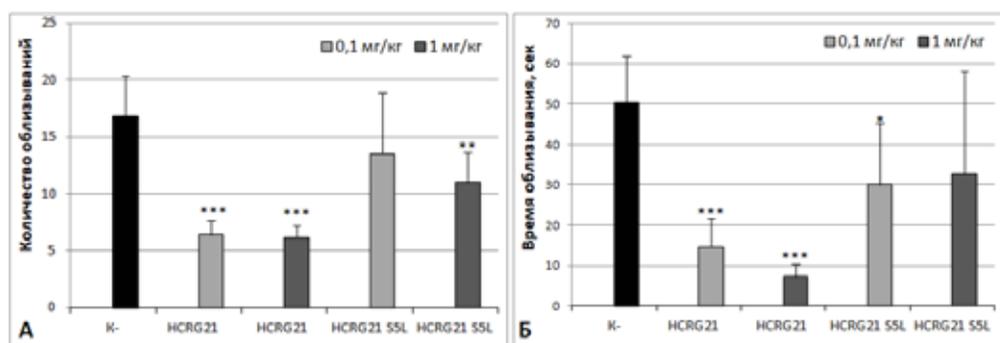


Рис. 1. Показатели ноцицептивного ответа у экспериментальных животных после введения капсаицина: количество облизываний (А), продолжительность облизывания (Б) поврежденной лапы и латентное время начала реакции на боль (В). Результаты представлены как MEAN ± SD при n = 7. Достоверные отличия представлены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

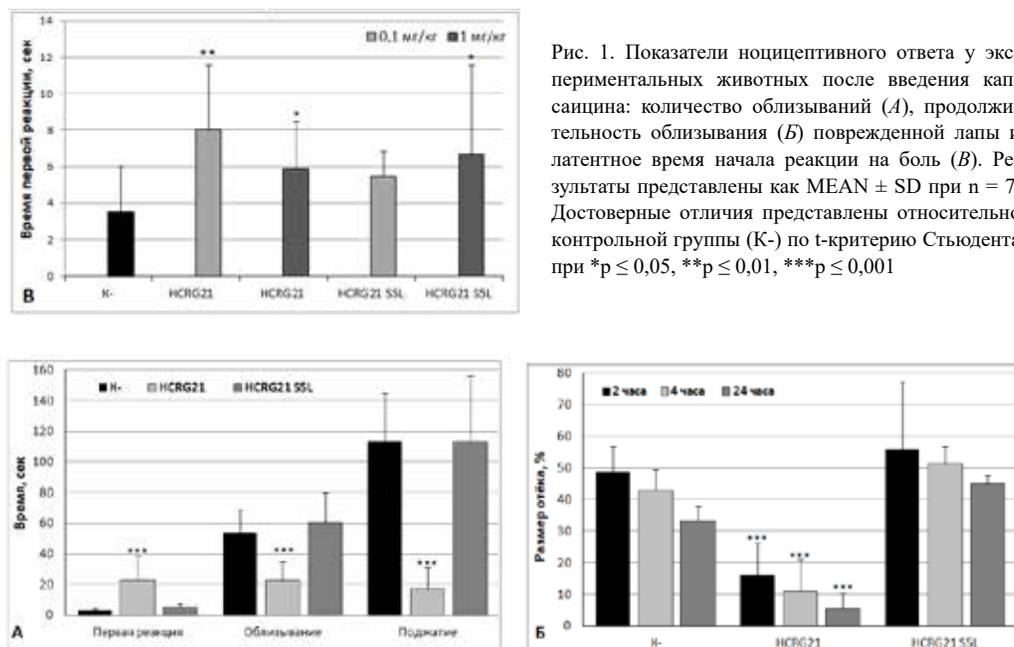


Рис. 2. Показатели АИТС-индуцированного ноцицептивного ответа у экспериментальных животных: латентное время начала реакции, продолжительность облизывания и поджатия поврежденной лапы (А); динамика изменения АИТС-индуцированного воспалительного отека лапы у мышей (Б). Результаты представлены как MEAN ± 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- $\alpha$  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- $\alpha$  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.).

