



## ОДИНОЧНАЯ МУТАЦИЯ В ПЕПТИДНОМ ИНГИБИТОРЕ РЕЦЕПТОРА TRPV1 ИЗМЕНЯЕТ ЭФФЕКТ НА ЖИВОТНЫХ С ГИПОТЕРМИЧЕСКОГО НА ГИПЕРТЕРМИЧЕСКИЙ

© 2017 г. И. А. Дьяченко\*, \*\*, \*\*\*\*\*, В. А. Паликов\*, \*\*, Ю. А. Паликова\*, \*\*, Г. И. Белоус\*, \*\*, А. Н. Мурашев\*, \*\*, \*\*\*\*\*, Я. А. Андреев\*\*\*, \*\*\*\*, \*\*\*\*\*, Ю. А. Логашина\*\*\*, \*\*\*\*, Е. Е. Малеева\*\*\*, **Е. В. Гришин\*\*\***, С. А. Козлов\*\*\*, #

\*Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Московская обл., г. Пущино, пр. Науки 6

\*\*Пущинский государственный естественно-научный институт, 142290, Московская обл., г. Пущино, пр. Науки 3

\*\*\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\*\*\*Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России, Институт молекулярной медицины, 119991 Москва, ул. Трубецкая 8, корп. 2

\*\*\*\*\*Российский университет дружбы народов, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

\*\*\*\*\*ФГБУН Пущинский научный центр Российской академии наук, 142290, Московская обл., г. Пущино, пр. Науки 3

Поступила в редакцию 06.04.2017 г.

Принята к печати 11.04.2017 г.

Рецептор TRPV1 играет значительную роль во многих биологических процессах, таких как восприятие внешней температуры (более 43°C), развитие воспаления и терморегуляция. Активация TRPV1 приводит к возникновению боли и снижению температуры тела, в то же время ингибирование может приводить к повышению температуры. Ранее были обнаружены и охарактеризованы пептидные модуляторы TRPV1 из экстракта морской анемоны *Heteractis crispa* (АРНС1 и АРНС3), которые проявляли выраженную анальгетическую активность и при этом снижали температуру тела экспериментальных животных. На основе аминокислотных последовательностей АРНС1 и АРНС3 нами была получена гибридная пептидная молекула, названная А13, содержащая в себе все потенциально важные для проявления активности пептидов-предшественников остатки. Биологические испытания на животных показали, что гибридная молекула комбинирует в себе анальгетические свойства обоих природных пептидов, но, в отличие от исходных пептидов, не понижает, а повышает температуру тела экспериментальных животных.

*Ключевые слова:* анальгетические пептиды, ваниллоидный рецептор TRPV1, функциональная экспрессия, гипотермия, гипертермия.

DOI: 10.7868/S0132342317050050

### ВВЕДЕНИЕ

Наиболее известным и изученным представителем семейства ионотропных рецепторов TRP является взаимодействующий с капсаицином ваниллоидный рецептор 1, TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1). Он считается полимодальным детектором разнообразных физических

и химических стимулов и участвует в генерации болевого сигнала. Рецептор TRPV1 играет значительную роль в таких биологических процессах, как восприятие внешней температуры (более 43°C), развитие воспаления и терморегуляция. Активация TRPV1 приводит к возникновению боли, снижению температуры тела, усилению потоотделения и впоследствии – к появлению повышенной чувствительности к болевым стимулам (гипералгезия) или болевых ощущений в ответ на неболевые раздражители (аллодиния) [1, 2]. TRPV1 играет важную роль в ряде патологиче-

Сокращения: TRPV1 – ваниллоидный рецептор 1; IPTG – изопрропил-β-D-1-тиогалактопиранозид; CFA – полный адьювант Фрейнда; TFA – трифторуксусная кислота.

\* Автор для связи (тел.: +7 (495) 336-40-22; факс: +7 (495) 330-73-01; эл. почта: serg@ibch.ru).

ских состояний: при болях воспалительного характера, раке, нейропатических и висцеральных болях, заболеваниях дыхательных путей, панкреатитах и мигренях [2]. Все это позволяет рассматривать рецептор TRPV1 как перспективную терапевтическую мишень в лечении различных заболеваний и, прежде всего, для уменьшения болевого синдрома.

TRPV1 является катион-селективным ионным каналом, который отвечает на присутствие капсаицина кратковременным деполяризующим входящим током и активируется повышенной температурой и/или низким значением pH. Данные, полученные в *in vivo*- и *in vitro*-экспериментах, позволяют считать TRPV1 важным полимодальным рецептором, который объединяет множественные сигналы о физических и химических стимулах и инициирует ответ чувствительного нейрона.

Ранее были обнаружены и охарактеризованы пептидные модуляторы TRPV1 из экстракта морской анемоны *Heteractis crispa* APHC1 и APHC3, которые проявляли выраженную анальгетическую активность и, в отличие от других антагонистов, снижали температуру тела экспериментальных животных [3–7]. Каждый из двух пептидов обладал индивидуальным характером анальгетического действия в ряде моделей болевой чувствительности, хотя их структурные отличия состоят только в 4 единичных аминокислотных заменах. Проанализировав построенные трехмерные модели пептидов, мы определили несколько функционально важных остатков и собрали их в новой гибридной молекуле – A13. Ее исследования в экспериментах *in vivo* показали, что гибридная молекула не просто комбинирует в себе анальгетические свойства обоих предшественников, но, в отличие от них, повышает температуру тела экспериментальных животных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

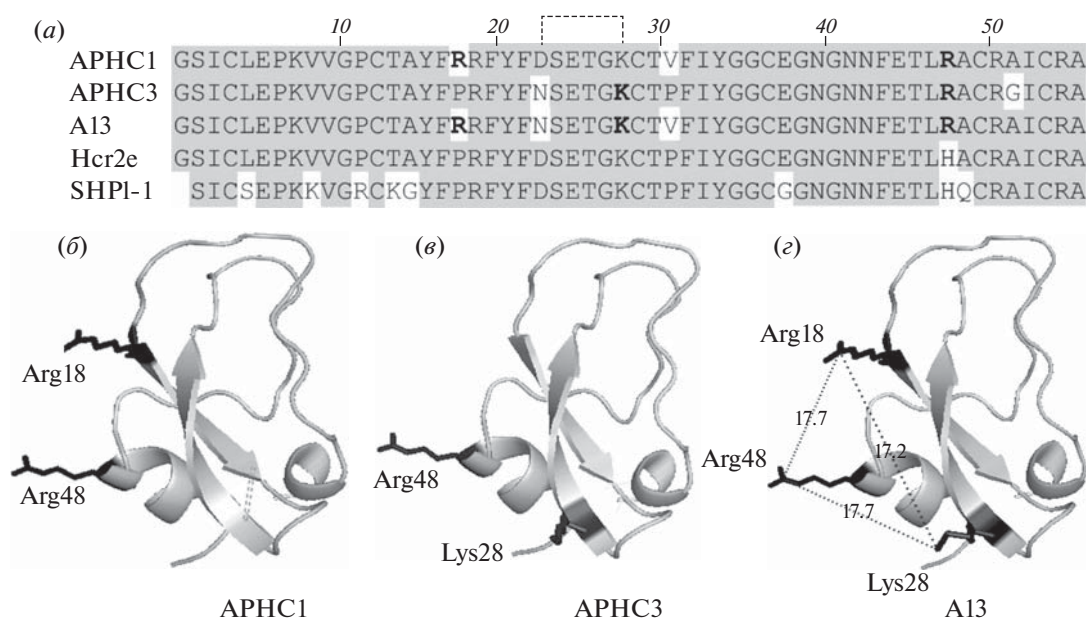
Сравнение анальгетических пептидов APHC1 и APHC3 (B2G331, C0HJF3)<sup>1</sup> с гомологичными ингибиторами протеаз SHTX-Hcr2e (P0DMJ5) и SHPI-1 (P31713) показывает не только значимость единичных аминокислотных замен, но и позволяет предположить потенциально важные остатки для взаимодействия с TRPV1 (рис. 1а). Наиболее очевидно это видно при анализе пространственных структур пептидов, которые были смоделированы и построены на базе разрешенной методами ЯМР структуры SHPI-1 (Protein Data Bank ID 1SHP). Пептиды имеют характерный тип укладки, богатой  $\alpha/\beta$ -элементами, типа BPT1/Kunitz, впервые описанный для ингибитора сериновых протеаз из поджелудочной железы быка (BPT1 – Bovine Pancreas Trypsin Inhibitor) [3, 5].

<sup>1</sup> В скобках указаны Uniprot ID для пептидов.

Известно, что связывающие участки токсинов обычно представляют собой комбинацию заряженных и гидрофобных аминокислот (например, блокаторы K<sup>+</sup>-каналов) [8, 9]. Во всех ингибиторах TRPV1 присутствует Arg48, и, соответственно, положительно заряженный остаток в этом положении отсутствует в пептидах SHTX-Hcr2e и SHPI-1. Остальные положительно заряженные аминокислотные остатки относительно равномерно распределены по всей длине сравниваемых молекул, поэтому мы использовали пространственное моделирование для выявления общих закономерностей, подразумевая наличие других необходимых для связывания с рецептором остатков.

Анализ пространственных моделей для APHC1 и APHC3 позволил выявить некоторые структурные особенности ингибиторов TRPV1, которые, видимо, определяют их способность связывания с рецептором. Оказалось, что оба пептида содержат по 2 положительно заряженных аминокислотных остатка на одной поверхности молекулы (для APHC1 это Arg18 и Arg48, а для APHC3 – Lys28 и Arg48) на одинаковом расстоянии ~18 Å (рис. 1б, 1в). Мы предположили, что комбинация участвующих в связывании с рецептором остатков от обеих молекул позволит получить пептид с еще более ярко выраженными анальгетическими свойствами за счет увеличения эффективности связывания с рецептором. Наиболее простым способом получить такой гибридный пептид (он был назван A13 (APHC1 + APHC3)), это внесение одной замены D23N в структуру молекулы APHC1. Вследствие такой замены исчезает солевой мостик Asp23-Lys28, который в исходной молекуле APHC1 разворачивал Lys28 в сторону от предполагаемой поверхности контакта лиганда с рецептором (рис. 1з); в результате этого на пространственной модели A13 три положительно заряженных остатка выстраиваются в равносторонний треугольник.

Аналогично тому, как ранее была разработана методика гетерологической экспрессии в *E. coli* для анальгетических пептидов, она была успешно воспроизведена для пептида A13. Синтетическую нуклеотидную последовательность клонировали в вектор pET32b+ и после трансформации штамма *E. coli* BL21(DE3) индуцировали экспрессию добавлением IPTG. В качестве белка-партнера был выбран тиоредоксин, который обеспечивает более высокий выход и правильное замыкание дисульфидных связей у цистеин-богатых белков. Гибридный белок тиоредоксин-A13 выделяли при помощи металлоаффинной хроматографии, а целевой пептид A13 выделяли из гидролизной смеси после расщепления BrCN по остатку Met, введенному перед первым аминокислотным остатком A13.



**Рис. 1.** Структура пептидов. (а) Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей пептидов из морских анемонов APHC1 (B2G331), APHC3 (C0HJF3), A13, и ингибиторов протеаз SHPI-1 (P31713), SHTX-Hcr2e (P0DMJ5). Идентичные аминокислотные остатки выделены серым. Аминокислотные остатки, потенциально важные для связывания анальгетических пептидов с TRPV1 выделены жирным шрифтом, пунктиром показан солевой мостик D23-K28 (б, в, г). Трехмерные пространственные модели, полученные молекулярным моделированием из структуры SHPI-1 (PDB ID: 1SHP, гомология первичной структуры ~81%) при помощи программы PyMol (DeLano Scientific). Показаны черным цветом боковые цепи остатков Arg18, Arg48, Lys28, пунктирной линией показаны расстояния между этими остатками.

В итоге после очистки с помощью ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой был получен симметричный хроматографический пик с молекулярной массой, соответствующей расчетной для рекомбинантного пептида A13. Удаление солевого мостика, таким образом, не меняло способность молекулы к сворачиванию и правильному замыканию дисульфидных связей. Выход целевого пептида A13 с 1 л культуры клеток *E. coli* составил ~3 мг. Выходы рекомбинантных пептидов APHC1 и APHC3, полученных для проведения данного исследования, были на уровне 3.3 и 8 мг с 1 л культуры соответственно.

Исследования анальгетической активности включали тесты, построенные на поведении животных при воздействии на них различных раздражителей. В таких тестах наличие возможного седативного эффекта исследуемого образца может исказить полученные результаты. Чтобы исключить потенциальное седативное действие пептида A13, провели исследование его влияния на тревожность и двигательную активность в эксперименте “открытое поле” (таблица). Внутривенное введение пептидов в предварительных экспериментах показало, что их концентрация в крови на 15-й минуте достигает максимального значения, поэтому все измерения проводили через 15 мин. Как и ожидалось в дозе 0.1 мг/кг достоверных отли-

чий от контрольной группы, получавшей 0.9% NaCl, по всем измеренным показателям не наблюдалось, кроме показателя пройденной дистанции. По сравнению с контролем мыши после внутривенного введения A13 сократили на треть пройденный путь, причем скорость передвижения при этом уменьшалась незначительно. Следовательно, результаты всех последующих тестов пептида A13 на животных моделях не были опосредованы его седативным действием.

TRPV1 рецепторы, прежде всего, – важные компоненты температурной чувствительности. Поэтому часто одним из основных используемых тестов для оценки эффективности модуляторов TRPV1 является тест “Горячая пластина”. В нем производится измерение порога острой болевой чувствительности и потенциального обезболивающего эффекта в ответ на термическое раздражение. Для A13 провели измерения в дозах 0.001–0.5 мг/кг, и во всех них время первого облизывания задних лап не отличалось от контрольной группы (рис. 2). Обе исходные молекулы при этом достоверно изменяли этот параметр в дозе 0.1 мг/кг (APHC1 также в дозе 0.01 мг/кг) в сторону увеличения. Таким образом, молекула A13 практически не обладает способностью ингибировать тепловую активацию TRPV1.

Параметры поведения животных в тесте “открытое поле” (общая продолжительность измерения 180 с) для контрольной группы животных ( $n = 10$ ) и группы с введенным внутривенно А13 в дозе 0.1 мг/кг ( $n = 9$ ) через 15 мин после введения. Разброс данных приведен как стандартная ошибка среднего значения (SEM), достоверное отличие параметров ( $P < 0.01$ ) отмечено \*\*

Параметр	Физ. раствор		А13		Изменение от контроля, %
	среднее	SEM	среднее	SEM	
Время неподвижности, с	56.0	3.8	51.5	3.0	-8
Неподвижность от общего времени, %	31.1	2.1	37.6	2.6	7
Время передвижения, с	124.0	3.8	114.5	4.1	-8
Передвижения от общего времени, %	68.9	2.1	68.0	2.6	-1
Дистанция, м	29.6	2.6	19.8	1.7	-33**
Время в центре, с	13.4	4.1	14.9	3.8	12
Время в центре от общего времени, %	7.4	2.3	8.3	2.1	1
Дистанция в центре, м	4.2	1.6	2.4	0.6	-42
Дистанция в центре от общей дистанции, %	12.2	3.5	11.3	2.6	-1
Время на периферии, с	166.6	4.1	165.1	3.8	-1
Время на периферии от общего времени, %	92.6	2.3	91.7	2.1	-1
Дистанция на периферии, м	25.3	1.5	23.6	1.8	-7
Дистанция на периферии от общей дистанции, %	87.8	3.5	88.7	2.6	1
Кол-во изменений центра тяжести	3513	222	3082	172	-12
Скорость во время передвижения, м/с	0.23	0.02	0.20	0.00	-13
Скорость за общее время, м/с	0.14	0.02	0.11	0.01	-21

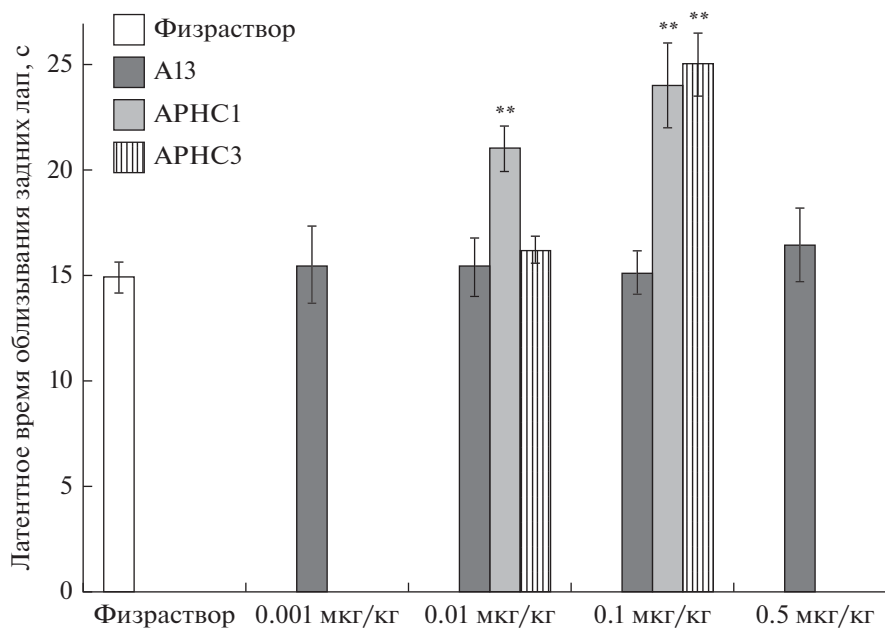
TRPV1 рецептор участвует в терморегуляции, и почти все его известные агонисты и антагонисты изменяют температуру тела. Рецепторы TRPV1 на специализированных чувствительных нейронах, иннервирующих брюшную полость, контролируют постоянство температуры тела, активируясь при нормальной температуре тела [10, 11]. Селективные агонисты TRPV1, такие как капсаицин, вызывают значительное снижение температуры тела. Влияние антагонистов на температуру тела является более сложным [12, 13]. Антагонисты, которые взаимодействуют с внутриклеточным капсаицин-связывающим карманом TRPV1, вызывают эффект гипертермии, если они способны ингибировать токи через TRPV1, индуцированные закислением [14, 15]. Антагонисты, которые потенцируют активацию TRPV1 при низких pH, либо снижают, либо не изменяют температуру тела [13, 15]. Введение АРНС1 вызывало заметное снижение температуры тела на 1.5°C, тогда как АРНС3 слабо снижал температуру тела [7].

Внутривенное введение пептида А13 в дозе 0.1 мг/кг вызвало достоверное увеличение температуры с 15-й минуты после введения (рис. 3). Гипертермический ответ на введение А13 наблюдался на протяжении 90 мин регистрации температуры и был сходен с эффектом низкомолекулярного антагониста AMG9810. Таким образом, исследуемый пептид А13 очевидно ингибирует TRPV1 и влияет на температуру тела как классический антаго-

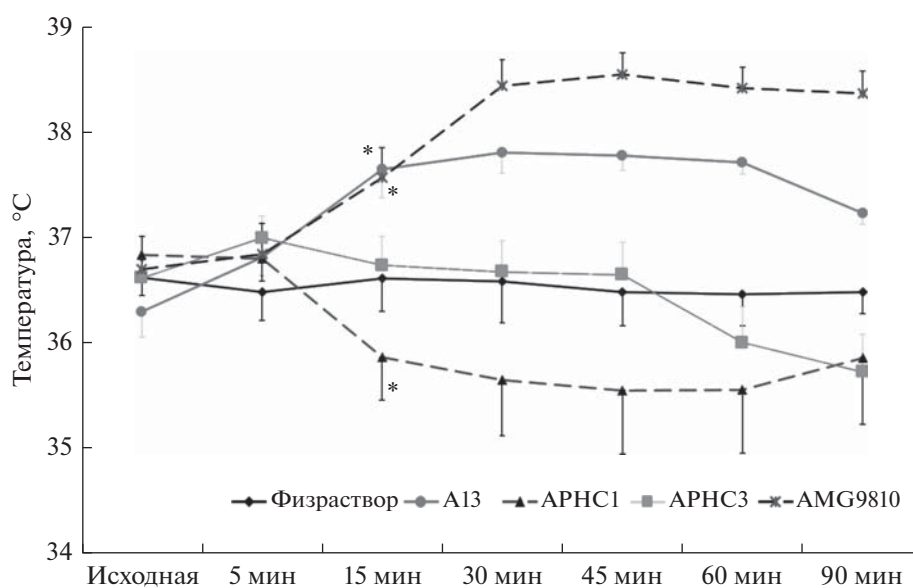
нист этого рецептора. Следовательно, антагонистические свойства А13 стали отличны от свойств обоих исходных анальгетических пептидов.

Гиперальгезия, индуцированная полным адьювантом Фрейнда (CFA), является многокомпонентным болевым раздражением, в котором разные воспалительные процессы действуют через несколько механизмов, снижая температурный порог открывания TRPV1, и повышая тепловую чувствительность [16, 17]. Внутривенное введение А13 в дозах 0.1 и 1 мг/кг достоверно увеличивали время нахождения на термостатируемой поверхности, возвращая тепловую чувствительность воспаленной лапы к норме (рис. 4). При более низких концентрациях наблюдали доза-зависимое снижение эффекта. Активность А13 достоверно не была отличима от активности исходных пептидов, но АРНС1 и АРНС3 все-таки проявили статистически значимую гиперальгезию в дозе 0.01 мг/кг. Таким образом, А13 сохранил свойства “родительских” молекул АРНС1/АРНС3 по снижению тепловой гиперчувствительности, вызванной воспалением.

TRPV1 рецепторы могут быть активированы низкими значениями внеклеточного pH, следовательно, они участвуют в распознавании боли, вызванной изменением кислотности. Измерить реакцию экспериментальных животных на изменение кислотности в брюшной полости позволяет тест химического раздражения брюшины



**Рис. 2.** Сравнение анальгетической активности пептидов в тесте горячая пластина. Измерения проводили через 15 мин после внутривенного введения на мышах CD-1 ( $n = 10$ ). Приведена среднеквадратичная ошибка измерения. Достоверные отличия показаны относительно контрольной группы (0.9% NaCl), \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

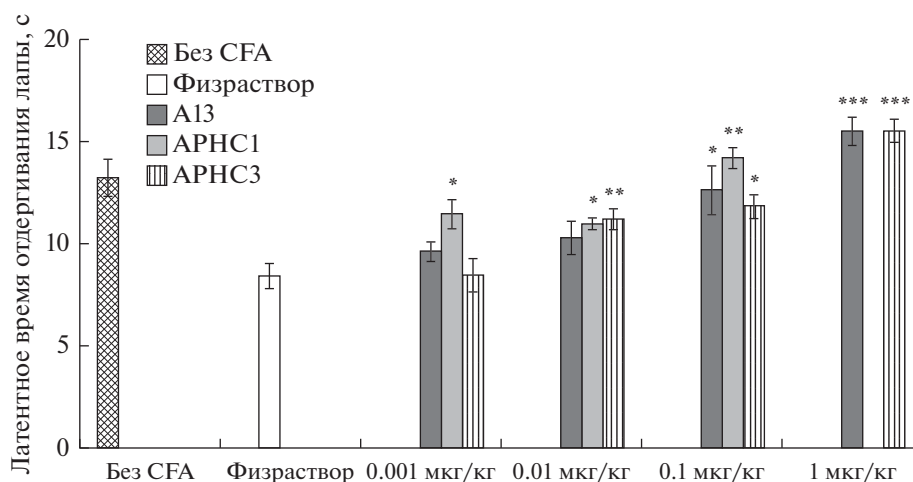


**Рис. 3.** График измерения температуры тела мышей CD-1 (ректально) после внутривенного введения пептида A13 в дозе 0.1 мг/кг ( $n = 10$ ). Для сравнения приведены данные, полученные на той же установке ранее для пептидов APHC1, APHC3 и AMG9810 в соответствии с [7]. Достоверное отличие (\*  $P < 0.05$ ) на 15-й минуте измерения определяли анализом вариабельности ANOVA с использованием теста Дункана от исходной температуры тела до введения пептида.

[18, 19]. Внутривенное введение уксусной кислоты вызывает очень стереотипное поведение у мышей и считается признаком интенсивной висцеральной боли [20]. Введение A13 за 15 мин до введения уксусной кислоты в исследуемых дозах (0.001, 0.1, 0.5 и 1 мг/кг) достоверно и концентрационно-зависимо снижало количество присту-

пов боли относительно контрольной группы (рис. 5). Молекулы, которые ингибируют [18] или потенцируют [15] кислото-индуцированные токи TRPV1, *in vitro* также снижают количества болевых приступов после инъекции уксусной кислоты.

Факт ярко выраженной активности в модели химического раздражения брюшины и гипертер-



**Рис. 4.** Сравнение анальгетической активности пептидов в тесте термической гипералгезии после моделирования воспаления CFA. Измерения проводили через 15 мин после внутривенного введения на мышах CD-1 ( $n = 10$ ). Приведена среднеквадратичная ошибка измерения. Достоверные отличия показаны относительно контрольной группы физраствор, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

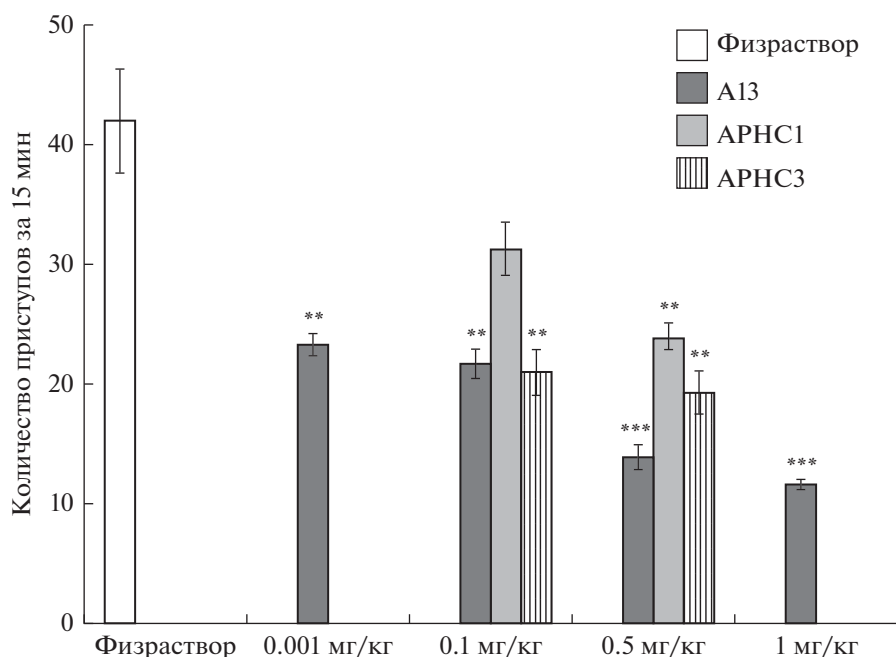
мической активности пептида A13 хорошо согласуются и косвенно могут служить доказательством способности A13 ингибировать кислото-индуцированные токи через TRPV1. Схожий биологический эффект в этой животной модели показал пептид АРНС3, в то время как АРНС1 обладал меньшей анальгетической активностью.

Суммируя вышеприведенные данные, мы смогли показать в данной работе, что одиночная замена в положении 23 остатка аспарагиновой кислоты на аспарагин в пептиде АРНС1 привела к значительному изменению свойств молекулы. Новый пептид A13 не изменяет тепловой чувствительности мышей, но проявляет наиболее значительную анальгетическую активность в модели боли, индуцированной кислотой, в отличие от пептида АРНС1. В то время как пептиды АРНС1 и АРНС3 снижают температуру тела экспериментальных животных, проявляя свойства неполных антагонистов TRPV1, полученный гибридный пептид A13 повышает температуру тела мышей, аналогично большинству непептидных антагонистов TRPV1, блокирующих все типы активации этого рецептора. Таким образом, нам удалось усилить анальгетические свойства АРНС1 путем “переноса” одного остатка из родственного пептида АРНС3. Замена в АРНС1 единственной аминокислоты (D23 → N23) привела к появлению анальгетических свойств, свойственных пептиду АРНС3, и появлению нового гипертермического действия, нехарактерного для обоих исходных пептидов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Получение рекомбинантных пептидов.** Для разработки рекомбинантных белков использовали вектора, кодирующие пептиды АРНС1 и АРНС3, которые были ранее получены и описаны [3, 5]. Для гибридной молекулы A13 новый ген получали с помощью ПЦР из праймеров, подобранных с учетом оптимальных кодонов для *E. coli*. Продукт амплификации обрабатывали рестриктазами EcoR1/Xho1, очищали с помощью гель-электрофореза и лигировали с расщепленной теми же рестриктазами плазмидой pET32b (Novagen, США). Лигаты трансформировали в клетки штамма XL1-Blue. Структура полученной плазмиды была подтверждена секвенированием.

Для экспрессии трансформировали клетки штамма BL21(DE3) методом электропорации. Клетки культивировали в среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), при 37°C с интенсивной аэрацией до достижения значения  $A_{600}$  0.6–0.8 (7–9 ч), после чего добавляли IPTG до конечной концентрации 0.2–0.4 мМ и инкубировали еще 12–16 ч при 24°C. Бактериальные клетки осаждали из раствора центрифугированием. Осадок клеток ресуспендировали в стартовом буфере (20 мМ Трис-НСl (рН 7.5) с 300 мМ NaCl) для металл-аффинной хроматографии, помещали в лед и подвергали ультразвуковой дезинтеграции 4 раза по 5 мин. Клеточный лизат центрифугировали при 9000 об./мин в течение 20 мин (4°C), и полученный супернатант наносили на аффинную колонку с  $Co^{2+}$ -сефарозой (Clonetech, США), уравновешенную стартовым буфером. Специфически сорбированную фракцию, содержащую гибридный белок, элюировали буфером (20 мМ Трис-НСl



**Рис. 5.** Сравнение анальгетической активности пептидов в тесте химического раздражения брюшины (уксусные корчи). Измерения проводили через 15 мин после внутривенного введения на мышах CD-1 ( $n = 10$ ). Приведена средне-квадратичная ошибка измерения. Достоверные отличия показаны относительно контрольной группы физраствор, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

(рН 7.5) с 300 мМ NaCl и 150 мМ имидазолом). К полученной фракции по методике [21] добавляли соляную кислоту до конечной концентрации 0.2 М и BrCN – 600-кратный молярный избыток по отношению к измеренному количеству белка. Реакцию гидролиза проводили 14–16 ч при комнатной температуре в темноте. Полученный гидролизат упаривали досуха, растворяли в 0.1% TFA и наносили на обращено-фазную колонку Jupiter C5 (Phenomenex, США)  $4.6 \times 250$  мм. Продукты реакции разделяли со скоростью 1 мл/мин в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (10–70% за 40 мин). Детекцию проводили спектрофотометрически при длинах волн 210 и 280 нм. Чистоту рекомбинантных продуктов оценивали масс-спектрометрией.

**Моделирование пространственных структур** проводили при помощи программы PyMOL 1.3. В качестве базовой модели использовали структурные данные, опубликованные [24] для ингибитора протеаз из морской анемоны *Stichodactyla helianthus* (PDB ID: 1SHP).

**Тесты на животных** выполняли на половозрелых самцах мышей CD-1 аутбредного стока. Возраст 7–12 недель, вес на момент экспериментов  $27.3 \pm 2.1$  г. Животные были получены в “Питомнике лабораторных животных ФИБХ”, г. Пущино. Животные содержались в комнате барьерного типа и индивидуально вентилируемых клетках. Условия содержания соответствовали стандар-

там, указанным в руководстве The Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Все процедуры по рутинному уходу за животными выполняли в соответствии с СОП лаборатории. Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены Институтской комиссией по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных (IACUC).

Биологическую активность исследуемых пептидов измеряли во всех экспериментах через 15 мин после внутривенного введения. Контрольным животным вводили 0.9% раствор NaCl.

Измерения порога **острой болевой чувствительности** и потенциального анальгезирующего эффекта изучаемого пептида в ответ на термическое раздражение проводили в тесте “Горячая пластина” (hot plate) [22]. В данном тесте учитывали только латентное время первого облизывания задних лап.

Оценка **париетовисцеральной боли** была исследована в тесте химического раздражения брюшины. За контролируемый период времени – 15 мин сразу после инъекции 0.6% раствора уксусной кислоты подсчитывали количество приступов париетовисцеральной боли (специфическая болевая реакция – также известная как “уксусные корчи”).

**Термическую гипералгезию при воспалении** оценивали субплантарным введением в заднюю лапу экспериментальных животных 20 мкл смеси CFA/0.9% NaCl (1 : 1). Через 21–24 ч после введе-

ния CFA экспериментальным животным вводили исследуемые образцы. Измерение порога болевой чувствительности проводили через 15 мин после введения образцов в тесте “Горячая пластина” ( $t = 52^{\circ}\text{C}$ ), контролируя только конечность с вызванным воспалением. Отмечали время первого одергивания лапы, в которую вводили CFA [23].

**Эксперимент открытое поле** для исследования двигательной активности исследуемого пептида A13 проводили в тесте двигательной активности на компьютеризированной установке TSE Multi Conditioning System Extended Advanced (США). Общая продолжительность измерения параметров составляла 3 мин. Была использована программа наблюдения за животными: TSE AatiMot (Activity & Hole Board Measuring System, США), с помощью которой были собраны и проанализированы контрольные параметры (таблица).

**Температуру тела** регистрировали на компьютеризированной системе AD Instruments США (Columbus Instruments, USA). Животных фиксировали в боксе и на 3–4 с вводили ректально специализированный датчик для мышей. Предварительно регистрировали исходную температуру экспериментальных животных, которым в дальнейшем вводили пептид A13. После внутривенного введения в дозе 0.1 мг/кг регистрировали температуру тела, на 5-й, 15-й, 30-й 45-й, 60-й и 90-й минуте после введения образца.

**Статистика** для всех количественных данных, полученных в ходе исследований, включала расчет стандартного отклонения от среднего значения. Статистическую значимость отличий устанавливали анализом вариабельности ANOVA с использованием теста Дункана. Статистический анализ был проведен программой Statistica for Windows 7.1. При значении показателя достоверности различий  $P < 0.05$  различия считали достоверными.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была поддержана РФФИ (грант № 15-04-04666), программой фундаментальных исследований президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, а также грантом Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ России НШ 7676.2016.4.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Szallasi A., Cortright D.N., Blum C.A., Eid S.R. // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2007. V. 6. P. 357–372.
2. Andreev Y.A., Vassilevski A.A., Kozlov S.A. // *Recent. Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 2012. V. 6. P. 35–45.
3. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Koshelev S.G. Ivanova E.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P., Grishin E.V. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 23914–23921.
4. Андреев Я.А., Козлов С.А., Козловская Е.П., Гришин Е.В. // Докл. АН. 2009. Т. 424. С. 688–691.
5. Козлов С.А., Андреев Я.А., Мурашев А.Н., Скобцов Д.И., Дьяченко И.А., Гришин Е.В. // *Биоорг. химия.* 2009. Т. 35. С. 789–798. [Kozlov S.A., Andreev Y.A., Murashev A.N., Skobtsov D.I., D'iachenko I.A., Grishin E.V. *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2009. V. 35. P. 711.]
6. Philyppov I.B., Paduraru O.N., Andreev Y.A., Grishin E.V., Shuba Y.M. // *Life Sci.* 2012. V. 91. P. 912–920.
7. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Korolkova Y.V., Dyachenko I.A., Bondarenko D.A., Skobtsov D.I., Murashev A.N., Kotova P.D., Rogachevskaja O.A., Kabanova N.V., Kolesnikov S.S., Grishin E.V. // *Mar. Drugs.* 2013. V. 11. P. 5100–5115.
8. Gasparini S., Danse J.M., Lecoq A., Pinkasfeld S., Zinn-Justin S., Young L.C., de Medeiros C.C., Rowan E.G., Harvey A.L., Ménez A. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 25393–25403.
9. Smith L.A., Reid P.F., Wang F.C., Parcej D.N., Schmidt J.J., Olson M.A., Dolly J.O. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 7690–7696.
10. Gavva N.R., Bannon A.W., Surapaneni S., Hovland D.N. Jr., Lehto S.G., Gore A., Juan T., Deng H., Han B., Kliensky L., Kuang R., Le A., Tamir R., Wang J., Youngblood B., Zhu D., Norman M.H., Magal E., Treanor J.J., Louis J.C. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. P. 3366–3374.
11. Steiner A.A., Turek V.F., Almeida M.C., Burmeister J.J., Oliveira D.L., Roberts J.L., Bannon A.W., Norman M.H., Louis J.C., Treanor J.J., Gavva N.R., Romanovsky A.A. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. P. 7459–7468.
12. Garami A., Shimansky Y.P., Pakai E., Oliveira D.L., Gavva N.R., Romanovsky A.A. // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. P. 1435–1440.
13. Romanovsky A.A., Almeida M.C., Garami A., Steiner A.A., Norman M.H., Morrison S.F., Nakamura K., Burmeister J.J., Nucci T.B. // *Pharmacol. Rev.* 2009. V. 61. P. 228–261.
14. Honore P., Chandran P., Hernandez G., Gauvin D.M., Mikusa J.P., Zhong C., Joshi S.K., Ghilardi J.R., Sevcik M., Fryer R.M., Segreti J.A., Banfor P.N., Marsh K., Neelands T., Bayburt E., Daanen J.F., Gomtsyan A., Lee C.H., Kort M.E., Reilly R.M., Surowy C.S., Kym P.R., Mantyh P.W., Sullivan J.P., Jarvis M.F., Faltynek C.R. // *Pain.* 2009. V. 142. P. 27–35.
15. Lehto S.G., Tamir R., Deng H., Kliensky L., Kuang R., Le A., Lee D., Louis J.C., Magal E., Manning B.H., Rubino J., Surapaneni S., Tamayo N., Wang T., Wang J., Wang J., Wang W., Youngblood B., Zhang M., Zhu D., Norman M.H., Gavva N.R. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008. V. 326. P. 218–229.
16. Davis J.B., Gray J., Gunthorpe M.J., Hatcher J.P., Davey P.T., Overend P., Harries M.H., Latcham J., Clapham C., Atkinson K., Hughes S.A., Rance K., Grau E., Harper A.J., Pugh P.L., Rogers D.C., Bingham S., Randall A., Sheardown S.A. // *Nature* 2000. V. 405. P. 183–187.
17. Jara-Oseguera A., Simon S.A., Rosenbaum T. // *Curr. Mol. Pharmacol.* 2008. V. 1. P. 255–269.
18. Tang L., Chen Y., Chen Z., Blumberg P.M., Kozikowski A.P., Wang Z.J. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007. V. 321. P. 791–798.



19. Ikeda Y., Ueno A., Naraba H., Ohishi S. // *Life Sci.* 2001. V. 69. P. 2911–2919.
20. Le Bars D., Gozariu M., Cadden S.W. // *Pharmacol. Rev.* 2001. V. 53. P. 597–652.
21. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Grishin E.V. // *Anal Biochem.* 2010. V. 1. 407. P. 144–146.
22. Вальдман А.В., Игнатов Ю.Д. // *Центральные механизмы боли.* Л.: Наука, 1976.
23. Narender R.G., Rami T., Yusheng Q. // *J. Pharmacology & Experimental Therapeutics.* 2005. V. 313. P. 474–484.
24. Antuch W., Berndt K.D., Chavez M.A., Delfin J., Wuthrich K. // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 212. P. 675–684.

## Single Mutation in Peptide Inhibited TRPV1 Receptor Changes Hypothermic Effect on Animals to Hyperthermic

I. A. Dyachenko<sup>\*, \*\*, \*\*\*\*\*</sup>, V. A. Palikov<sup>\*, \*\*, Yu. A. Palikova<sup>\*, \*\*, G. I. Belous<sup>\*, \*\*, A. N. Murashev<sup>\*, \*\*, \*\*\*\*\*</sup>, Ya. A. Andreev<sup>\*\*\*, \*\*\*\*, \*\*\*\*\*</sup>, Yu. A. Logashina<sup>\*\*\*\*, \*\*\*\*\*</sup>, E. E. Maleeva<sup>\*\*\*</sup>, **E. V. Grishin<sup>\*\*\*</sup>**, and S. A. Kozlov<sup>\*\*\*, #</sup></sup></sup></sup>

# Phone: +7 (495) 336-40-22; e-mail: serg@ibch.ru

\*Branch of the Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 6, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

\*\*Pushchino State Institute of Natural Science, pr. Nauki 3, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

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

\*\*\*\*Sechenov First Moscow State Medical University, Institute of Molecular Medicine, ul. Trubetskaya 8, str. 2, Moscow, 119991 Russia

\*\*\*\*\*Russian University of Peoples' Friendship, ul. Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117198 Russia

\*\*\*\*\*Pushchino Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 3, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

The TRPV1 receptor plays a significant role in many biological processes, such as external temperature (above 43°C) perception, inflammation development and thermoregulation. Activation of TRPV1 leads to a pain generation and decreasing of body temperature, while inhibition of this receptor can lead to an increase of temperature. TRPV1 peptide modulators from sea anemone *Heteractis crispa* extract (APHC1 and APHC3) were characterized early as molecules possessed pronounced analgesic effect and decreasing a body temperature of experimental animals. Combining of amino acid sequences APHC1 and APHC3 lead to a hybrid peptide molecule construction named A13 that keeps all potentially important for activity residues. Biological tests on animals shown that the hybrid molecule not only combines the analgesic properties of both peptides, but also raises the body temperature of experimental animals.

*Keywords:* sea anemone, analgesic peptides, vanilloid receptor, functional expression, hypothermia, hyperthermia