

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук

Научный доклад об основных результатах научно-квалификационной
работы

**«Пептидная регуляция медленных натриевых каналов
первичного сенсорного нейрона»**

Калинина Арина Дмитриевна

Научная специальность: 1.5.5 Физиология человека и животных

Научный руководитель:
старший научный сотрудник
лаборатории физиологии возбудимых мембран
Института физиологии им. И. П. Павлова РАН,
к.б.н. Плахова Вера Борисовна

Санкт-Петербург
2023

Оглавление

Актуальность исследования	3
Цели и задачи исследования	4
Основные положения, выносимые на защиту	4
Научная новизна исследования.....	5
Теоретическое и практическое значение работы	6
Материалы и методы исследования	6
Результаты и обсуждение	9
Заключение	15
Выводы.....	16
Апробация работы.....	16
Список работ, опубликованных по теме исследования	17
Список цитированной литературы	20

Актуальность исследования

Боль – это неприятное сенсорное и эмоциональное ощущение, которое возникает в ответ на фактическое или потенциальное повреждение тканей. Боль необходима для защиты и выживания организма. Однако болевые ощущения, которые сохраняются на протяжении долгого времени, перестают выполнять информационную функцию и становятся обременительными (Cohen et al., 2021). В отличие от острой боли, хроническая боль не имеет важного физиологического значения и может рассматриваться как отдельная патология (Clauw et al., 2019).

Для купирования хронической боли в клинической практике используют анальгетические препараты. Длительное системное применение обезболивающих средств зачастую провоцирует развитие необратимых нежелательных явлений, которые особенно выражены при назначении сильнодействующих анальгетических препаратов, таких как опиаты и опиоиды (Guy et al, 2017). Для широкого спектра заболеваний и патологических состояний лекарственные препараты данной группы являются единственной терапевтической опцией ввиду отсутствия более безопасных альтернатив.

Решением проблемы здравоохранения – проблемы хронической боли – может стать разработка новых безопасных и высокоэффективных анальгетических препаратов. В качестве одного из подходов может быть рассмотрен поиск веществ эндогенной природы, которые способны модулировать функциональную активность натриевых каналов Nav1.8. Эти каналы мембраны нейронов дорзальных ганглиев в настоящее время хорошо изучены и могут считаться молекулярными маркерами ноцицептивных нейронов (Bennett et al., 2019). Снижение функциональной активности каналов Nav1.8 приводит к устранению только высокочастотной компоненты импульсной активности, которая несет информацию о болевом ощущении в центральную нервную систему. В то же время, низкочастотная компонента импульсной активности останется неизменной, что позволит сохранить передачу информации в головной мозг о других адекватных сенсорных сигналах, распознаваемых полимодальными ноцицепторами (Krylov et al., 2017).

Одним из перспективных подходов к решению указанной проблемы является изучение взаимодействия каналов Nav1.8 с короткими пептидными молекулами. К основным преимуществам коротких пептидов относятся их низкая иммуногенность и отсутствие токсических эффектов благодаря их эндогенной природе. Для коротких пептидов характерен минимальный уровень неспецифического связывания с клеточными структурами (Apostolopoulos et al., 2021).

Таким образом, короткие пептиды, специфически модулирующие функциональную активность каналов Nav1.8, могут претендовать на роль эффективных и безопасных

анальгетических субстанций, поэтому в настоящей работе был исследован ряд вновь синтезированных коротких аргинин- и лизинсодержащих пептидов.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы было изучение молекулярных механизмов лиганд-рецепторного связывания ряда коротких аргинин- и лизинсодержащих пептидов с медленными натриевыми каналами Nav1.8.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. Изучить методом локальной фиксации потенциала влияние ряда коротких аргининсодержащих пептидов на перенос эффективного заряда (Z_{eff}) активационного воротного устройства медленного натриевого канала Nav1.8.
2. Выяснить роль положительно заряженных гуанидиновых групп в атакующей молекуле в процессе модуляции величины Z_{eff} при взаимодействии с каналом Nav1.8. На основании анализа полученных данных оценить эффективное расстояние между гуанидиновыми группами аргининов в составе коротких пептидов, способных снижать Z_{eff} .
3. Провести конформационный анализ молекулы пептида Ac-Lys-Glu-Lys-Lys-NH₂ (Ac-КЕКК-NH₂). Определить величины расстояний между аминокетильными группами боковых цепей лизинов, играющих, благодаря ион-ионному взаимодействию, центральную роль при лиганд-рецепторном связывании пептида с активационным воротным устройством канала Nav1.8.
4. В качестве атакующей молекулы использовать лизинсодержащий пептид Ac-КЕКК-NH₂ для выяснения его влияния на величину Z_{eff} активационного воротного устройства канала Nav1.8. Уточнить роль положительно заряженных аминокетильных групп боковых цепей лизинов, находящихся на таком же расстоянии друг от друга, как и гуанидиновые группы аргининов, входящих в состав коротких пептидов, способных снижать Z_{eff} .
5. Выяснить в экспериментах *in vivo* (формалиновый тест) возможное анальгетическое действие лизинсодержащего пептида Ac-КЕКК-NH₂.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Методом локальной фиксации потенциала выяснено модулирующее действие ряда коротких аргининсодержащих пептидов на перенос Z_{eff} активационного воротного устройства канала Nav1.8. Для осуществления лиганд-рецепторного связывания с молекулой канала Nav1.8 молекула атакующего пептида должна содержать не менее

двух положительно заряженных гуанидиновых групп аргинильных остатков, находящихся на эффективном расстоянии 12 ± 3 ангстрем (Å).

- Исследования короткого лизинсодержащего пептида Ac-KEKK-NH₂ подтвердили, что данное соединение модулирует функциональную активность натриевых каналов Nav1.8, причем аминокислотные боковые цепи лизинильных остатков должны находиться на эффективном расстоянии 11–12 Å друг от друга для обеспечения ион-ионных взаимодействий атакующей молекулы пептида с активационным воротным устройством канала Nav1.8. Эксперименты *in vivo* позволили обнаружить антиноцицептивный эффект этой субстанции на организменном уровне.

Научная новизна исследования

В работе впервые было исследовано лиганд-рецепторное связывание коротких пептидов Ac-Arg-Arg-Arg-NH₂ (**Ac-RRR-NH₂**), H-Arg-Arg-Arg-OH (**H-RRR-OH**), Ac-Arg-Ala-Arg-NH₂ (**Ac-RAR-NH₂**), Ac-Arg-Glu-Arg-Arg-NH₂ (**Ac-RERR-NH₂**), Ac-Arg-Glu-Ala-Arg-NH₂ (**Ac-REAR-NH₂**), Ac-Arg-Ala-Ala-Arg-NH₂ (**Ac-RAAR-NH₂**), Ac-Arg-Glu-Ala-Ala-Arg-NH₂ (**Ac-REAAR-NH₂**), Ac-Lys-Glu-Lys-Lys-NH₂ (**Ac-KEKK-NH₂**) с натриевыми каналами Nav1.8 мембраны ноцицептивных нейронов. Показано, что короткие пептиды Ac-RRR-NH₂, H-RRR-OH, Ac-RERR-NH₂ и Ac-KEKK-NH₂ снижают Z_{eff} активационного воротного устройства медленного натриевого канала Nav1.8, что свидетельствует об антиноцицептивной активности данных субстанций. Важно отметить, что модулирующее действие аргининсодержащих трипептидов на активационное воротное устройство канала Nav1.8 сохранялось и в том случае, когда N- и C-концевые группы трипептида H-RRR-OH были структурно модифицированы до Ac-RRR-NH₂ за счет N-концевого ацетилирования и C-концевого амидирования для защиты пептида от протеолитического действия экзопептидаз во время доставки пептида к его молекулярной мишени – каналу Nav1.8.

Согласно результатам конформационного анализа, численные значения расстояний между положительно заряженными гуанидиновыми группами боковых цепей аргинильных остатков при лиганд-рецепторном связывании изучаемых аргининсодержащих пептидов с молекулой канала Nav1.8 должны находиться в диапазоне 12 ± 3 Å. На основании данных, полученных методом локальной фиксации потенциала, а также посредством конформационного анализа, оказалось возможным сделать вывод о том, что лиганд-рецепторное связывание пептидов обеспечивается образованием ион-ионных связей между положительно заряженными функциональными группами боковых цепей аминокислот аргинина или лизина и молекулой канала Nav1.8.

Эффективные расстояния между положительно заряженными аминогруппами боковых цепей лизина также находятся в данном диапазоне и составляют 11–12 Å.

Анальгетический эффект тетрапептида Ac-KEKK-NH₂ на организменном уровне впервые был подтвержден в экспериментах с использованием формалинового теста.

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты исследования представляются важными для более глубокого понимания механизмов лиганд-рецепторного связывания субстанций пептидной природы с натриевыми каналами мембраны ноцицептивного нейрона. Данные, полученные в ходе исследования, однозначно указывают на то, что изученные короткие аргинин- и лизинсодержащие пептиды являются перспективными кандидатами на роль безопасных анальгетических субстанций, что может быть использовано при разработке новых лекарственных препаратов, остро необходимых практической медицине.

Материалы и методы исследования

Синтез коротких пептидов. Короткие пептиды Ac-Arg-Arg-Arg-NH₂ (**Ac-RRR-NH₂**), H-Arg-Arg-Arg-OH (**H-RRR-OH**), Ac-Arg-Ala-Arg-NH₂ (**Ac-RAR-NH₂**), Ac-Arg-Glu-Arg-Arg-NH₂ (**Ac-RERR-NH₂**), Ac-Arg-Glu-Ala-Arg-NH₂ (**Ac-REAR-NH₂**), Ac-Arg-Ala-Ala-Arg-NH₂ (**Ac-RAAR-NH₂**), Ac-Arg-Glu-Ala-Ala-Arg-NH₂ (**Ac-REAAR-NH₂**), Ac-Lys-Glu-Lys-Lys-NH₂ (**Ac-KEKK-NH₂**), исследуемые в настоящей работе, были синтезированы в научно-производственной фирме Верта (Санкт-Петербург, Россия) методом классического пептидного синтеза с использованием реагентов Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Массачусетс, США) и Iris Biotech GmbH (Марктредвиц, Германия). Вновь синтезированные пептиды оценивали методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (чистота более 95%) и масс-спектрометрии.

Культура сенсорных нейронов. Сенсорные нейроны были выделены из спинальных ганглиев областей L₅–S₁ новорожденных крыс линии *Wistar* методом краткосрочного культивирования. После ферментативной обработки (2 мл раствора Хенкса, 2 мл среды Игла, 2 мг/мл коллагеназы типа 1А, 1 мг/мл проназы Е, 1 ммоль/л НЕРЕС Na, pH = 7,4) диссоциированные сенсорные нейроны осаждали на дне пластиковой чашки Петри в течение 30 мин при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Жизнеспособные нейроны использовали для регистрации натриевых токов каналов Nav1.8 в течение нескольких часов.

Метод локальной фиксации потенциала. Регистрация медленных натриевых токов каналов Nav1.8 проводилась методом локальной фиксации потенциала («patch-clamp») в конфигурации «регистрация активности целой клетки» («whole-cell

recording»). Ионные токи регистрировали в контроле и после действия вновь синтезированных коротких аргинин- и лизинсодержащих пептидов в концентрациях 100 нмоль/л.

Стеклянные микроэлектроды изготавливали с помощью пуллера для микропипеток Р-97 («Sutter Instrument», США). Особое внимание было уделено измерению последовательного сопротивления R_S , которое автоматически рассчитывалось в ритме эксперимента по первой экспоненте спада емкостного тока в ответ на гиперполяризационный прямоугольный импульс в соответствии с теорией Ю. В. Осипчука и Е. Н. Тимина (Osipchuk, Timin, 1984). Величина R_S не превышала 3 МОм. В противном случае измерения проводятся с ошибкой, поэтому опыт прекращался.

В ходе экспериментов использовались следующие растворы, которые позволяют регистрировать только медленные натриевые токи каналов Nav1.8:

- Внеклеточный раствор, заполняющий экспериментальную ванночку: 70 ммоль/л хлорида холина, 65 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л HEPES Na, 2 ммоль/л CaCl₂, 2 ммоль/л MgCl₂ и 0,1 нмоль/л тетродотоксина (pH = 7,4).
- Внутриклеточный раствор, заполняющий стеклянный микроэлектрод: 100 ммоль/л CsF, 40 ммоль/л CsCl, 10 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л HEPES Na и 2 ммоль/л MgCl₂ (pH = 7,2).

Модифицированный метод Алмерса. Для количественной оценки величины эффективного заряда (Z_{eff}) активационного воротного устройства канала Nav1.8 применяли модифицированный метод Алмерса (Almers 1978; Krylov et al., 2017).

Отношение числа открытых каналов Nav1.8 (N_O) к числу закрытых каналов (N_C) может быть определено как $\frac{N_O}{N_C} = \frac{G_{Na}(E)}{G_{Na}^{max} - G_{Na}(E)}$, где G_{Na}^{max} и $G_{Na}(E)$ – максимальное значение и потенциалозависимость хордовой проводимости соответственно.

Функция потенциалозависимости хордовой проводимости $G_{Na}(E)$ может быть определена по экспериментальным данным, полученным с помощью метода локальной фиксации потенциала, как $G_{Na}(E) = \frac{I_{ampl}(E)}{E - E_{Na}}$, где I_{ampl} – значение амплитуды натриевого тока, E_{Na} – потенциал реверсии натриевого тока.

$G_{Na}(E)$ является монотонной функцией, приближающейся к своему максимальному значению G_{Na}^{max} при положительном E . Тогда, согласно теории Алмерса:

$$\lim_{E \rightarrow -\infty} L(E) = \lim_{E \rightarrow -\infty} \ln \frac{G_{Na}(E)}{G_{Na}^{max} - G_{Na}(E)} \xrightarrow{E \rightarrow -\infty} \text{const} \cdot \exp\left(\frac{Z_{eff} \cdot e_0 \cdot E}{k \cdot T}\right),$$

где k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, C – константа, e_0 – заряд электрона.

Когда мембранный потенциал E стремится к минус бесконечности, величину Z_{eff} можно оценить по тангенсу угла наклона асимптоты, проходящей через первые точки, определяемые отрицательными значениями E . Предел исследуемой функции при данных потенциалах стремится к одноэкспоненциальной зависимости, представляющей собой распределение Больцмана.

Далее можно определить предельную логарифмическую чувствительность $L(E)$, количественная оценка которой – величина Z_{eff} – служит показателем потенциалочувствительности исследуемых каналов:

$$L(E) = \ln \left(\frac{G_{\text{Na}}(E)}{G_{\text{Na}}^{\text{max}} - G_{\text{Na}}(E)} \right).$$

Асимптота, проходящая через первые, полученные при самых отрицательных значениях E , точки функции $L(E)$, позволяет вычислить Z_{eff} , который линейно пропорционален тангенсу угла наклона асимптоты.

Формалиновый тест. Исследование анальгетического эффекта короткого лизинсодержащего пептида Ас-КЕКК-NH₂ проводилось согласно следующему протоколу (Butkevich et al., 2019). Взрослым самцам крыс линии *Wistar* ($n = 16$) внутрибрюшинно вводили пептид Ас-КЕКК-NH₂, разведенный в 1 мл раствора Хенкса (3,0 мг/кг, экспериментальная группа, $n = 8$), или 1 мл раствора Хенкса (контрольная группа, $n = 8$). Через 5 мин после инъекции исследуемого вещества животным выполняли подкожную инъекцию формалина (2,5%, 50 мкл) в подошву левой задней лапы и помещали животное в экспериментальную камеру (25 × 25 × 25 см) с прозрачными стенками. Регистрацию специфических паттернов ответа на инъекцию формалина – сгибание + встряхивание (спинальный уровень) и вылизывание (супраспинальный уровень) левой задней конечности – проводили в течение 1 часа после инъекции ноцицептивного раздражителя с использованием специального программного обеспечения.

Конформационный анализ. Для проведения конформационного анализа молекулы пептида Ас-КЕКК-NH₂ использовали программный комплекс TINKER 8.0 с применением силового поля MMFF94.

Статистический анализ данных. Обработку и статистический анализ экспериментальных данных производили с помощью программного обеспечения STATISTICA 10.0 (StatSoft, США) с использованием t-критерия Стьюдента. Различия средних значений принимались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Короткие аргининсодержащие пептиды в наномолярных концентрациях модулируют активность каналов Nav1.8.

В ходе экспериментов методом локальной фиксации потенциала были получены записи медленных натриевых токов в контроле и после действия изучаемых коротких аргининсодержащих пептидов (Рисунок 1А). Дальнейшая обработка экспериментальных данных с помощью модифицированного метода Алмерса (Рисунок 1Б–Г) позволила определить значения Z_{eff} активационного воротного устройства канала Nav1.8 в серии экспериментов.

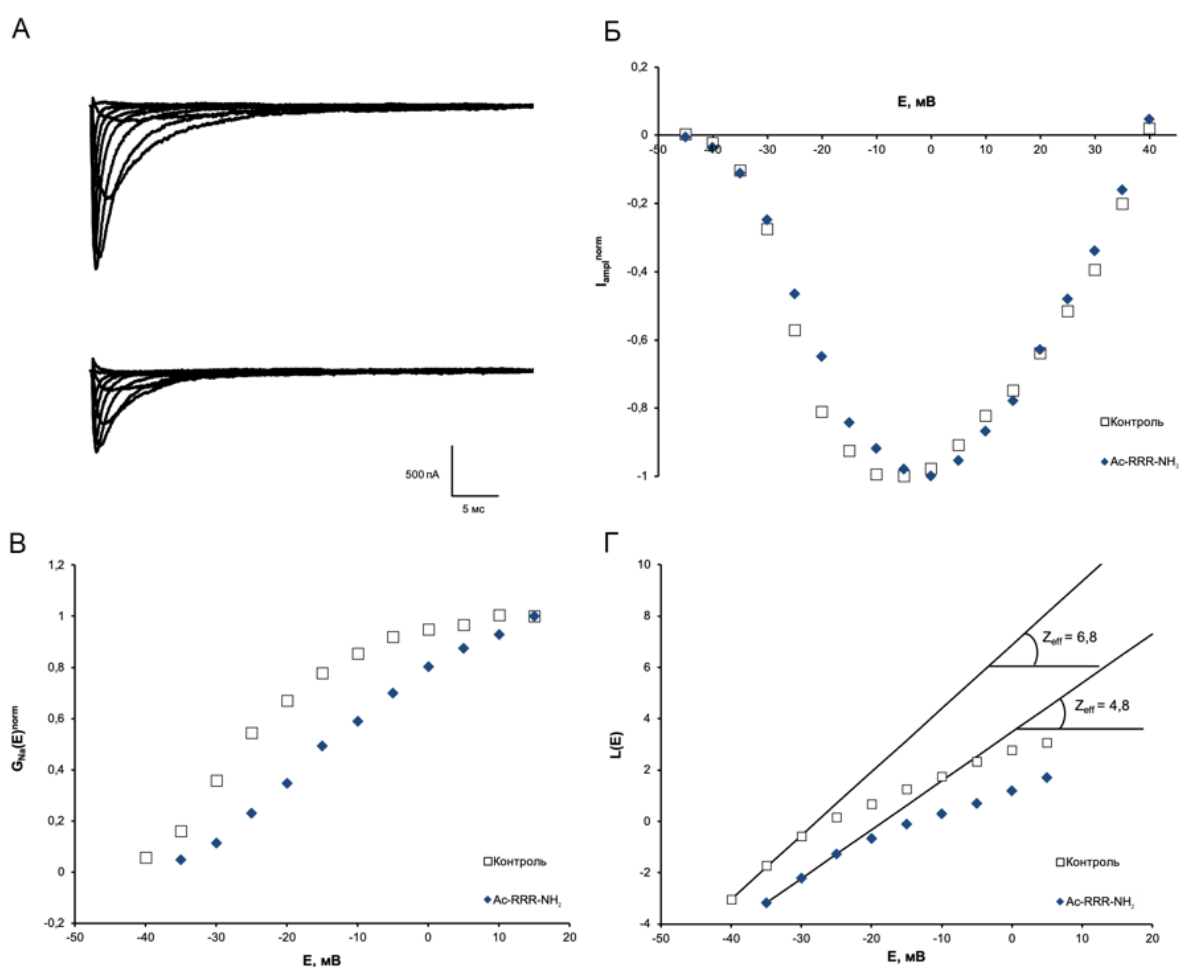


Рисунок 1. Влияние трипептида Ac-RRR-NH₂ в концентрации 100 нмоль/л на потенциалочувствительность медленных натриевых каналов Nav1.8. А – Семейства медленных натриевых токов в контроле (вверху) и после действия трипептида Ac-RRR-NH₂ (внизу) с наружной стороны мембраны ноцицептивного нейрона; Б – Нормированные значения пиковых вольт-амперных характеристик медленных натриевых каналов Nav1.8; В – График зависимости хордовой проводимости от потенциала; Г – Определение величины Z_{eff} активационного воротного устройства натриевых каналов Nav1.8 в контроле и после действия трипептида Ac-RRR-NH₂.

Значения Z_{eff} активационного воротного устройства натриевых каналов $\text{Nav}1.8$ в контроле составили $Z_{\text{eff}} = 6,5 \pm 0,4$ ($n = 23$) и после приложения пептидов (100 нмоль/л): H-RRR-OH $Z_{\text{eff}} = 4,9 \pm 0,3$ ($n = 22$); Ac-RRR-NH₂ $Z_{\text{eff}} = 4,8 \pm 0,4$ ($n = 19$); Ac-RAR-NH₂ $Z_{\text{eff}} = 6,5 \pm 0,3$ ($n = 20$); Ac-RERR-NH₂ $Z_{\text{eff}} = 4,6 \pm 0,3$ ($n = 23$); Ac-REAR-NH₂ $Z_{\text{eff}} = 6,5 \pm 0,3$ ($n = 22$); Ac-RAAR-NH₂ $Z_{\text{eff}} = 6,6 \pm 0,3$ ($n = 16$); Ac-REAAR-NH₂ $Z_{\text{eff}} = 6,2 \pm 0,3$ ($n = 17$).

Аргининсодержащие пептиды Ac-RRR-NH₂, H-RRR-OH, Ac-RERR-NH₂ статистически значимо снижали величину Z_{eff} активационного воротного устройства натриевых каналов $\text{Nav}1.8$ по сравнению с контрольными значениями (Рисунок 2). Модулирующее действие коротких пептидов, содержащих аминокислотную последовательность из трех аргининов, на активационное воротное устройство канала $\text{Nav}1.8$ сохранялось после структурных модификаций трипептида H-RRR-OH (N-концевое ацетилирование, C-концевое амидирование) для защиты от протеолитического действия экзопептидаз с образованием трипептида Ac-RRR-NH₂.

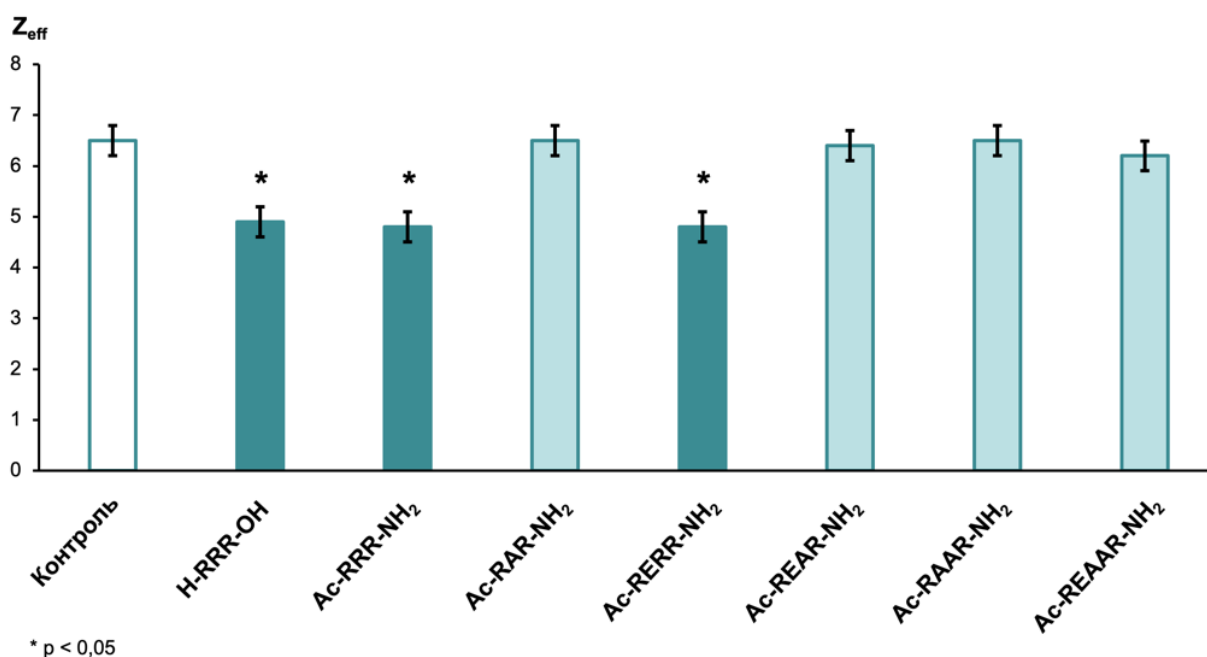


Рисунок 2. Снижение величины Z_{eff} в серии экспериментов после действия коротких аргининсодержащих пептидов по сравнению с контрольными значениями

Лизинсодержащий пептид Ас-КЕКК-NH₂ в наномолярных концентрациях модулирует активность каналов Nav1.8.

Аналогично экспериментам с аргининсодержащими пептидами, методом локальной фиксации потенциала было изучено влияние лизинсодержащего тетрапептида Ас-КЕКК-NH₂ на медленные натриевые каналы Nav1.8 (Рисунок 3).

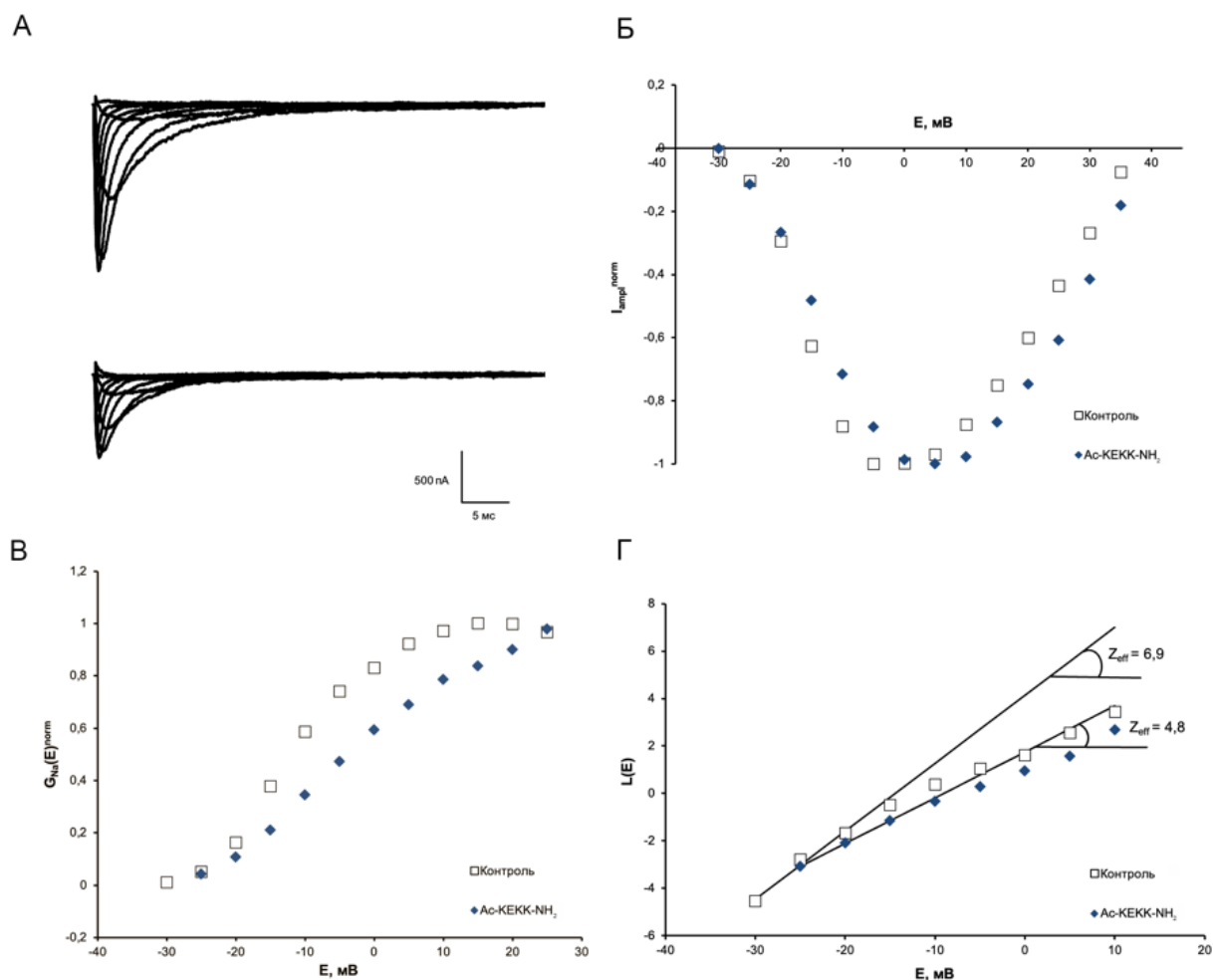


Рисунок 3. Влияние тетрапептида Ас-КЕКК-NH₂ в концентрации 100 нмоль/л на потенциалочувствительность медленных натриевых каналов Nav1.8. А – Семейства медленных натриевых токов в контроле (вверху) и после действия тетрапептида Ас-КЕКК-NH₂ (внизу) с наружной стороны мембраны ноцицептивного нейрона; Б – Нормированные значения пиковых вольт-амперных характеристик медленных натриевых каналов Nav1.8; В – График зависимости хордовой проводимости от потенциала; Г – Определение величины Z_{eff} активационного воротного устройства натриевых каналов Nav1.8 в контроле и после действия тетрапептида Ас-КЕКК-NH₂.

Действие короткого лизинсодержащего пептида Ас-КЕКК-NH₂ в концентрации 100 нмоль/л приводило к статистически значимому снижению величины Z_{eff} с $6,5 \pm 0,4$ ($n = 27$) в контрольных экспериментах до $4,8 \pm 0,4$ ($n = 27$) после приложения пептида (Рисунок 4). Важно отметить, что снижение величины Z_{eff} с $6,4 \pm 0,3$ ($n = 17$) в контроле

до $4,6 \pm 0,3$ ($n = 23$) наблюдалось и при действии аналогичного аргининсодержащего пептида Ac-RERR-NH₂ в той же концентрации.

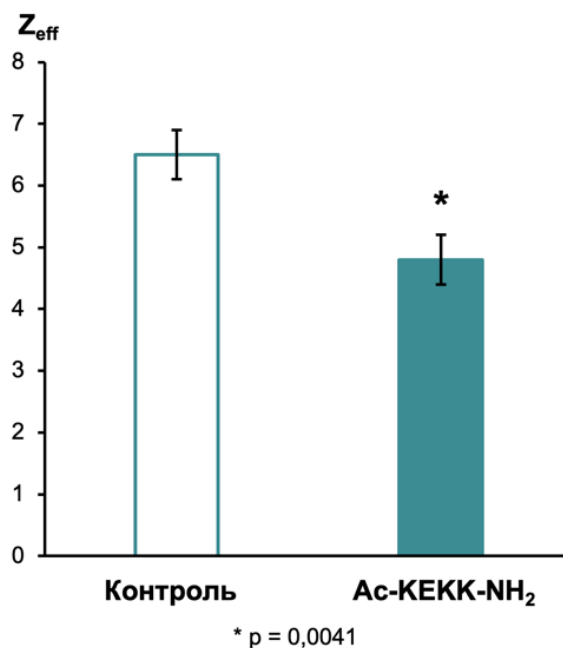


Рисунок 4. Снижение величины Z_{eff} после действия тетрапептида Ac-KEKK-NH₂ (100 нмоль/л) в серии экспериментов по сравнению с контрольными значениями

Лизинсодержащий пептид Ac-KEKK-NH₂ продемонстрировал анальгетический эффект в исследованиях in vivo (формалиновый тест).

Внутрибрюшинная инъекция лизинсодержащего пептида Ac-KEKK-NH₂ (3,0 мг/кг) экспериментальным крысам за 5 минут до подкожной инъекции формалина вызывала снижение длительности вылизывания в течение первых 6 минут формалин-индуцированного воспаления. Динамика продолжительности вылизывания в первой острой фазе (Ф1) в контроле и у экспериментальных животных представлена на Рисунке 5А. Тетрапептид Ac-KEKK-NH₂ снижал продолжительность вылизывания и во второй тонической фазе (Ф2), то есть приводил к уменьшению болевых ощущений. Средние значения продолжительности вылизывания у экспериментальных и контрольных крыс в острой ($6,4 \pm 3,9$ vs. $34,2 \pm 8,1$, $p = 0,008$) и тонической ($60,9 \pm 10,4$ vs. $176,9 \pm 21,5$, $p < 0,001$) фазах представлены на Рисунке 5Б.

Во время острой фазы не продемонстрировано статистически значимой разницы между экспериментальными и контрольными животными относительно числа сгибаний + встряхиваний ($17,0 \pm 7,0$ vs. $31,0 \pm 8,4$, $p = 0,2372$). Однако во время тонической фазы у экспериментальных животных наблюдалось значимое уменьшение числа сгибаний + встряхиваний ($55,6 \pm 18,7$ vs. $490,4 \pm 109,9$, $p = 0,0016$) (Рисунок 5В).

Таким образом, анальгетический эффект короткого лизинсодержащего тетрапептида Ас-КЕКК-NH₂ при воздействии формалина был обнаружен как на спинальном, так и на супраспинальном уровнях ноцицептивной системы.

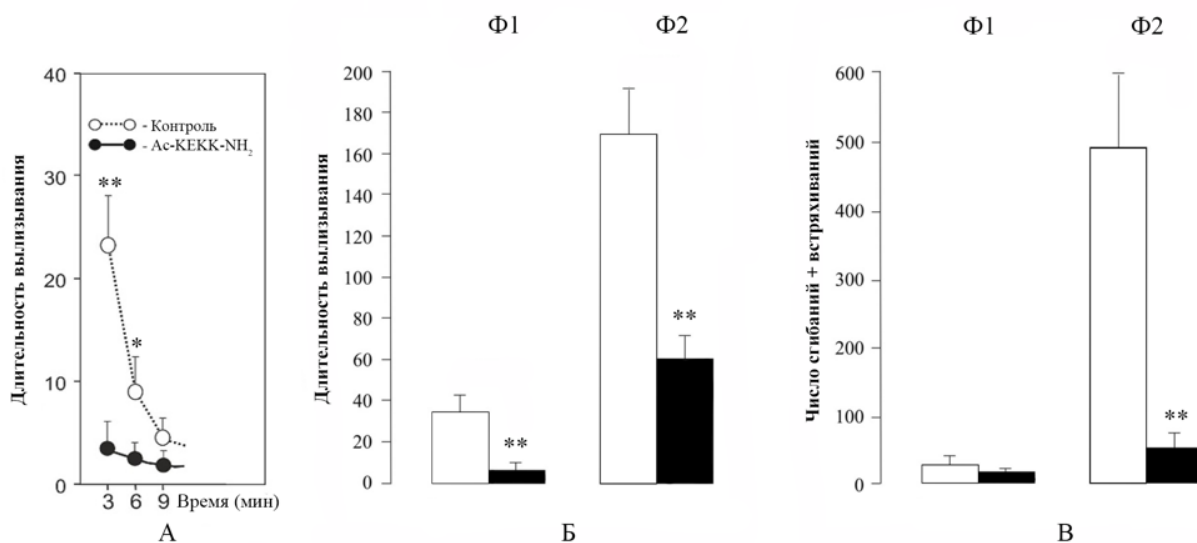


Рисунок 5. Влияние тетрапептида Ас-КЕКК-NH₂ на продолжительность вылизывания и число сгибаний + встряхиваний в формалиновом тесте. А – Динамика продолжительности вылизывания в острой фазе (Ф1) после подкожной инъекции формалина; Б – длительность вылизывания в острой (Ф1) и тонической (Ф2) фазах; В – число сгибаний + встряхиваний в острой (Ф1) и тонической (Ф2) фазах. Данные представлены в виде среднего значения ± SEM. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Лиганд-рецепторное связывание пептида Ас-КЕКК-NH₂ с каналами Na_v1.8 обеспечивается за счет ион-ионных взаимодействий

При моделировании физиологически адекватных условий ($\epsilon = 80$) карбоксильная группа боковой цепи глутаминовой кислоты в молекуле пептида Ас-КЕКК-NH₂ была заряжена отрицательно (далее обозначено как Ас-КЕКК-NH₂ ch). При моделировании белкового окружения ($\epsilon = 10$) в момент лиганд-рецепторного связывания атакующего пептида с молекулой канала Na_v1.8, карбоксильная группа рассматривалась также и в незаряженной форме, поскольку в этом случае степень протонирования не была заранее известна (Ас-КЕКК-NH₂ unch). Наиболее низкоэнергетические конформации молекулы Ас-КЕКК-NH₂ представлены на рисунке 6.

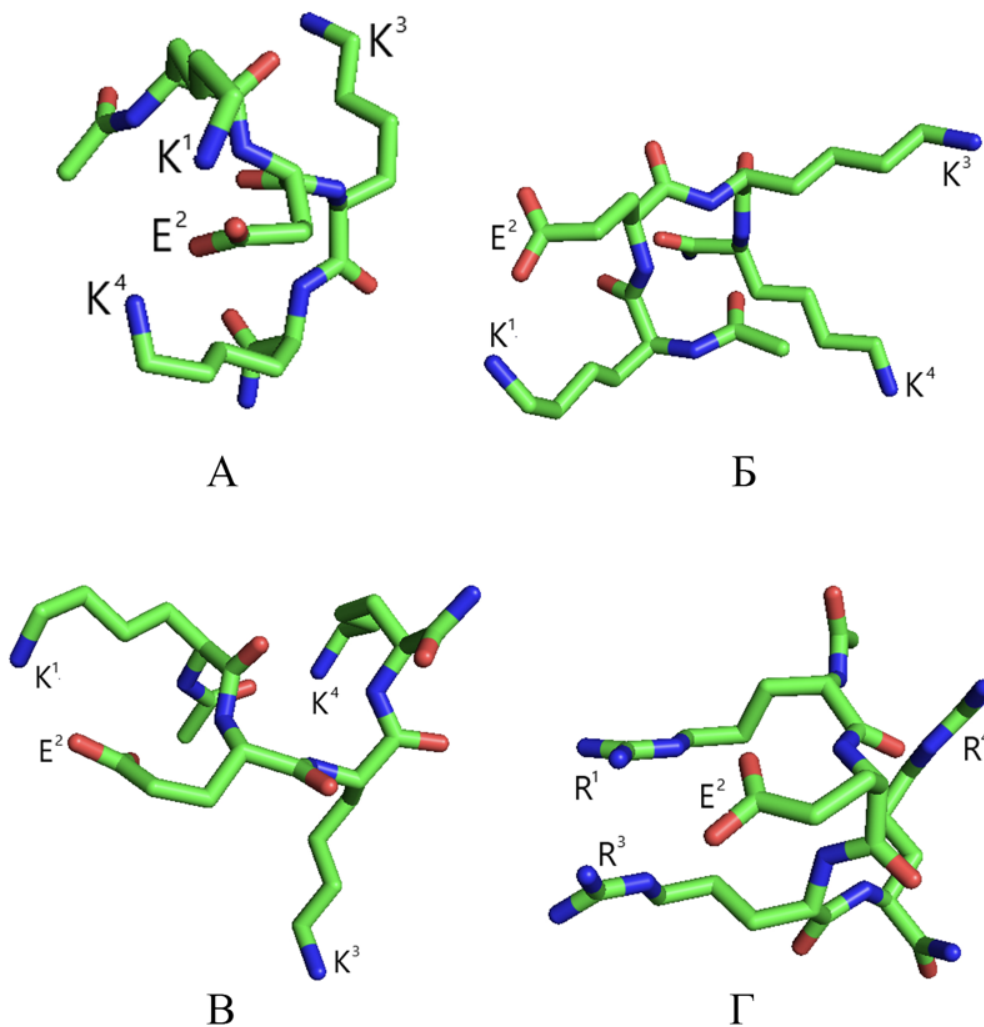


Рисунок 6. Наиболее низкоэнергетические конформации пептидов, полученные с помощью конформационного анализа. А – Ac-KEKK-NH₂ ch, $\epsilon = 10$; Б – Ac-KEKK-NH₂ ch, $\epsilon = 80$; В – Ac-KEKK-NH₂ unch, $\epsilon = 10$; Г – Ac-RERR-NH₂ ch, $\epsilon = 10$. Углерод – зеленый, кислород – красный, азот – синий. Атомы водорода не изображены.

В ходе конформационного анализа были рассчитаны расстояния между положительно заряженными аминогруппами боковых цепей лизина в молекуле Ac-KEKK-NH₂, необходимые для реализации лиганд-рецепторного связывания с молекулой канала Nav1.8: расстояния K1-K3 составили 11–12 Å, расстояния K1-K3 и K3-K4 составили ~11 Å.

Заключение

В настоящей работе изучен механизм лиганд-рецепторного связывания коротких аргинин- и лизинсодержащих пептидных молекул с натриевыми каналами Nav1.8 мембраны ноцицептивных нейронов. Методологический подход включал в себя несколько экспериментальных методик: метод локальной фиксации потенциала и последующее определение эффективного заряда активационного воротного устройства каналов Nav1.8 с использованием метода Алмерса, формалиновый тест и теоретический конформационный анализ.

В ходе экспериментов с использованием метода локальной фиксации потенциала было показано, что ряд коротких аргининсодержащих пептидов, соответствующих небольшому участку известной нативной аминокислотной последовательности дефенсина кролика NP-1 (Plakhova et al., 2002), а также модифицированные в соответствии с нашим дизайном их производные, способны снижать Z_{eff} и эффективно модулировать активационное воротное устройство канала Nav1.8. Экспериментальные результаты и конформационный анализ позволили определить, что эффективное расстояние между положительно заряженными гуанидиновыми группами боковых цепей аргининов, участвующих в образовании ион-ионных связей пептида с каналом Nav1.8, составляет $12 \pm 3 \text{ \AA}$.

Конформационный анализ молекулы Ac-KEKK-NH₂ показал, что расстояние между положительно заряженными аминогруппами боковых цепей лизинов в продуктивной конформации также составляет 11–12 Å, что позволило предсказать его эффективность при лиганд-рецепторном связывании с каналом Nav1.8. Эта гипотеза была подтверждена методом локальной фиксации потенциала: вновь синтезированный лизинсодержащий тетрапептид Ac-KEKK-NH₂ снижал Z_{eff} активационного воротного устройства указанного канала. Антиноцицептивный эффект тетрапептида был подтвержден в условиях формалинового теста как на спинальном, так и на супраспинальном уровнях.

Таким образом, при замене положительно заряженных гуанидиновых групп в аргининсодержащих пептидах на положительно заряженные аминогруппы в лизинсодержащем тетрапептиде, находящиеся на таком же эффективном расстоянии $12 \pm 3 \text{ \AA}$, проявлялось сильное снижение функциональной активности каналов Nav1.8. Это указывает на важную роль ион-ионных взаимодействий при лиганд-рецепторном связывании аргинин- и лизинсодержащих коротких пептидов с молекулой канала Nav1.8 и свидетельствует о перспективности дальнейшего исследования указанных агентов в качестве возможных претендентов на роль анальгетических лекарственных субстанций.

Выводы

1. Короткие аргининсодержащие пептиды Ac-RRR-NH₂, H-RRR-OH, Ac-RERR-NH₂ достоверно снижают Z_{eff} активационного воротного устройства медленного натриевого канала Nav1.8. Короткие аргининсодержащие пептиды Ac-RAR-NH₂, Ac-RAAR-NH₂, Ac-REAR-NH₂, Ac-REAAR-NH₂ не влияют на Z_{eff} активационного воротного устройства медленного натриевого канала Nav1.8.
2. Межмолекулярные ион-ионные связи при лиганд-рецепторном связывании пептидов с молекулой канала Nav1.8 образуются при наличии в молекуле атакующего пептида не менее двух положительно заряженных гуанидиновых групп аргинильных остатков, которые должны находиться на эффективном расстоянии $12 \pm 3 \text{ \AA}$.
3. Согласно данным конформационного анализа, положительно заряженные аминокислотные боковые цепи лизинов в молекуле Ac-KEKK-NH₂ находятся на расстоянии 11–12 Å друг от друга, что соответствует диапазону эффективных расстояний между гуанидиновыми группами в молекулах аргининсодержащих пептидов при лиганд-рецепторном связывании с молекулой канала Nav1.8.
4. Результаты, полученные методом локальной фиксации потенциала, показали, что короткий лизинсодержащий тетрапептид Ac-KEKK-NH₂ достоверно снижает Z_{eff} активационного воротного устройства медленных натриевых каналов Nav1.8. Это согласуется с результатами теоретических расчетов и свидетельствует о принципиально важной роли эффективного расстояния между заряженными аминокислотными боковыми цепями лизинсодержащего тетрапептида Ac-KEKK-NH₂ в процессе лиганд-рецепторного связывания указанного пептида с молекулой канала Nav1.8.
5. Антиноцицептивное действие тетрапептида Ac-KEKK-NH₂ исследовано в экспериментах *in vivo* с помощью формалинового теста. Установлено, что анальгетический эффект указанной субстанции проявляется как на спинальном, так и на супраспинальном уровнях.

Апробация работы

По теме научно-исследовательской работы было опубликовано 6 статей в рецензируемых научных изданиях. Научные результаты были представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и международных конференциях.

Список работ, опубликованных по теме исследования

Статьи в рецензируемых научных изданиях

1. **Kalinina A. D.**, Rogachevskii I. V., Samosvat D. M., Zegrya G. G., Butkevich I. P., Mikhailenko V. A., Plakhova V. B., Penniyaynen V. A., Podzorova S. A., Krylov B. V. Analgesic Effect of the Lysine-Containing Short Peptide Is Due to Modulation of the Nav1.8 Channel Activation Gating System // *Life*. – 2023. – V. 13. – № 9, 1800.
2. Rogachevskii I. V., Plakhova V. B., Penniyaynen V. A., **Kalinina A. D.**, Podzorova S. A., Samosvat D. M., Zegrya G. G., Krylov B. V. Arginine-containing tripeptides as analgesic substances: the possible mechanism of ligand-receptor binding to the slow sodium channel // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – № 11, 5993.
3. Plakhova V. B., Samosvat D. M., Zegrya G. G., Penniyaynen V. A., **Kalinina A. D.**, Ке М., Podzorova S. A., Krylov B. V., Rogachevskii I. V. Role of the Guanidinium Groups in Ligand–Receptor Binding of Arginine-Containing Short Peptides to the Slow Sodium Channel: Quantitative Approach to Drug Design of Peptide Analgesics // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – № 18, 10640.
4. Рогачевский И. В., **Калинина А. Д.**, Пеннийайнен В. А., Терехин С. Г., Подзорова С. А., Крылов Б. В., Плахова В. Б. Возможный механизм модуляции короткими пептидами медленных натриевых каналов мембраны сенсорного нейрона // *Биофизика*. – 2021. – Т. 66. – № 4. – С. 684–695.
Переводная версия:
Rogachevsky I. V., **Kalinina A. D.**, Penniyaynen V. A., Terekhin S. G., Podzorova S. A., Krylov B. V., Plakhova V. B. A Possible Mechanism of Modulation of Slow Sodium Channels in the Sensory Neuron Membrane by Short Peptides // *Biophysics*. – 2021. – V. 66. – № 4. – P. 579–588.
5. Плахова В. Б., Рогачевский И. В., Пеннийайнен В. А., Подзорова С. А., **Калинина А. Д.**, Крылов Б. В., Ноздрачев А. Д. Модуляция потенциалочувствительности медленных натриевых каналов синтетическим циклическим пептидом // *Физиология человека*. – 2021. – Т. 47. – № 5. – С. 102–109.
Переводная версия:
Plakhova V. B., Rogachevskii I. V., Penniyaynen V. A., Podzorova S. A., **Kalinina A. D.**, Krylov B. V., Nozdrachev A. D. Modulation of Voltage Sensitivity of Slow Sodium Channels by a Synthetic Cyclic Peptide // *Human Physiology*. – 2021. – V. 47. – № 5. – P. 564–570.
6. Рогачевский И. В., Самосват Д. М., **Калинина А. Д.**, Зегря Г. Г., Крылов Б. В., Подзорова С. А., Плахова В. Б. Возможный механизм лиганд-рецепторного

связывания синтетического трипептида Ac-RRR-NH₂ с мембраной ноцицептивного нейрона // Интегративная физиология. – 2021. – Т. 2. – № 4. – С. 412–419.

Тезисы научных конференций

1. **Калинина А. Д.**, Бойченко Н. А., Рогачевский И. В., Плахова В. Б. Возможные механизмы лиганд-рецепторного связывания синтетических коротких аргининсодержащих пептидов с медленными натриевыми каналами // Сборник тезисов XXIV съезда физиологического общества им. И. П. Павлова (11–15 сентября 2023 г., г. Санкт-Петербург, Россия). – С-Пб.: ООО «Издательство ВВМ», 2023. – С. 135.
2. **Kalinina A. D.**, Plakhova V. B., Rogachevskii I. V. Fragments of the endogenous antibiotic defensin and their derivatives as possible analgesic substances. International Mini-conference «Antimicrobial peptides as prototypes of novel antibiotics». 19–20 July 2023, Saint Petersburg, Russia.
3. **Калинина А. Д.**, Бойченко Н. А. Модуляция медленных натриевых каналов короткими лизинсодержащими пептидами // Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье [Электронный ресурс]: материалы XXVI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей (22 апреля 2023 года) / под ред. А. М. Сараны [и др.]; Санкт-Петербургский государственный университет. – Электронные данные. – Санкт-Петербург: Сциентиа, 2023. – Том XXVI. – С. 724–725.
4. Плахова В. Б., Рогачевский И. В., **Калинина А. Д.** Возможные механизмы лиганд-рецепторного связывания синтетических коротких пептидов с мембраной ноцицептивного нейрона // Интегративная физиология: Всероссийская конференция с международным участием, Санкт-Петербург (7–9 декабря 2022 г.). – Тезисы докладов. – СПб.: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2022. – С. 59.
5. **Калинина А. Д.**, Плахова В. Б. Модуляция медленных натриевых каналов лизинсодержащим тетрапептидом // Интегративная физиология: Всероссийская конференция с международным участием, Санкт-Петербург (7–9 декабря 2022 г.). – Тезисы докладов. – СПб.: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2022. – С. 71.
6. **Калинина А. Д.** Влияние лизинсодержащего тетрапептида на медленные натриевые каналы ноцицептивных нейронов // Сборник тезисов XXVI научной школы-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (26-27 октября 2022 г.); Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. – Москва: Квант Медиа, 2022. – С. 134–137.

7. **Калинина А. Д.** Модуляция медленных натриевых каналов аргининсодержащим трипептидом // Интегративная физиология: Всероссийская конференция с международным участием, Санкт-Петербург (8–10 декабря 2021 г.). – Тезисы докладов. – СПб.: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2021. – С. 70–71.
8. **Калинина А. Д.** Влияние аргининсодержащего трипептида на медленные натриевые каналы ноцицептивных нейронов // Сборник трудов XXV научной школы-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии; Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. – М.: Квант Медиа, 2021. – С. 137–140.
9. **Калинина А. Д., Терехин С. Г.** Возможные механизмы модуляции короткими аргининсодержащими пептидами возбудимости ноцицептивных нейронов // XXIV Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье»: материалы научной конференции / Санкт-Петербургский гос. ун-т. – СПб. : Сциентиа, 2021. – С. 812–813.
10. **Калинина А. Д.** Влияние циклического аргининсодержащего декапептида на медленные натриевые каналы ноцицептивных нейронов // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова. [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс, 2021.
11. **Калинина А. Д., Терехин С. Г.** Влияние коротких аргининсодержащих пептидов на медленные натриевые каналы ноцицептивных нейронов // Актуальные проблемы биомедицины – 2021: Материалы XXVII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием, Санкт-Петербург, 25-26 марта 2021 г. / Отв. ред. Т.Д. Власов. – СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2021. – С. 171–172.
12. **Калинина А. Д., Терехин С. Г., Плахова В. Б.** Короткие пептиды модулируют потенциальную чувствительность медленных натриевых каналов сенсорных нейронов // Интегративная физиология: Всероссийская конференция с международным участием, посвящённая 95-летию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург (9-11 декабря 2020 г.). – Тезисы докладов. – СПб.: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2020. – С. 72.
13. **Калинина А. Д.** Возможные механизмы модуляции короткими пептидами возбудимости ноцицептивных нейронов // Актуальные проблемы биомедицины – 2020: Сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с

международным участием, Санкт-Петербург, 26-27 марта 2020 г. / Отв. ред. Т.Д. Власов. – СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2020. – С. 245–246.

Список цитированной литературы

1. Almers W. Gating Currents and Charge Movements in Excitable Membranes. // *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. – 1978. – V. 82. – P. 96–190.
2. Apostolopoulos V., Bojarska J., Chai T-T., et al. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives // *Molecules*. – 2021. – V. 26. – № 2. – P. 430.
3. Bennett D. L., Clark A. J., Huang J., et al. The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling // *Physiological Reviews*. – 2019. – V. 99. – № 2. – P. 1079–1151.
4. Butkevich I. P., Mikhailenko V. A., Vershinina E. A., Barr G. A. Differences Between the Prenatal Effects of Fluoxetine or Bupirone Alone or in Combination on Pain and Affective Behaviors in Prenatally Stressed Male and Female Rats // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. – 2019. – V. 13. – P. 125.
5. Clauw D. J., Essex M. N., Pitman V., Jones K. D. Reframing Chronic Pain as a Disease, Not a Symptom: Rationale and Implications for Pain Management // *Postgraduate Medicine*. – 2019. – V. 131. – № 3. – P. 185–198.
6. Cohen S. P., Vase L., Hooten W. M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances // *The Lancet*. – 2021. – V. 397. – № 10289. – P. 2082–2097.
7. Guy G. P., Zhang K., Bohm M. K., et al. Signs: Changes in Opioid Prescribing in the United States, 2006–2015 // *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*. – 2017. – V. 66. – № 26. – P. 697–704.
8. New Non-opioid Analgesics: Understanding Molecular Mechanisms on the Basis of Patch-clamp and chemical Studies / B. V. Krylov, I. V. Rogachevskii, T. N. Shelykh, V. B. Plakhova. – UAE: Bentham Science Publishers Ltd., 2017. – 203 p.
9. Osipchuk Y. V., Timin, E. N. Electrical Measurements on Professed Cells // *Intracellular Perfusion of Excitable Cells* / Kostyuk P. G., Krishtal O. A. – London, United Kingdom: John Wiley and Sons., 1984. – P. 103–129.
10. Plakhova V. B., Shchegolev B. F., Rogachevskii I. V., Nozdrachev A. D., Krylov B. V., Podzorova S. A., Kokryakov V. N. A Possible Molecular Mechanism for the Interaction of Defensin with the Sensory Neuron Membrane // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2002. – V. 32. – P. 409–415.