

Г.А. Савченко, А.А. Василевський, К.А. Плужников, Ю.В. Королькова,
М.В. Маменко, Т.М. Волкова, О.П. Максимюк, Я.А. Бойчук, Є.В. Грішин,
О.О. Кришталь

Пептидні компоненти отрути *Geolycosa* sp. модулюють активність P2X-рецепторів сенсорних нейронів щурів

*Природные яды являются огромными комбинаторными «библиотеками» биоактивных веществ, оптимизированных в течение эволюции. Особое внимание при поиске новых модуляторов ионных каналов традиционно уделяется членистоногим. В нашей работе мы изучали влияние пептидных компонентов яда *Geolycosa* sp. на активность P2X-рецепторов сенсорных нейронов заднекорешковых ганглиев крыс. В результате многостадийного фракционирования яда были обнаружены как минимум 7 пептидных модуляторов, действующих на P2X-опосредованные ионные токи сенсорных нейронов крыс.*

ВСТУП

Природні отрути та токсини є практично невичерпним джерелом біомолекул, що мають величезний терапевтичний і біотехнологічний потенціал, оскільки первинними мішенями цих речовин виступають мембранні рецептори та різноманітні ферментативні системи. Взаємодія природних нейротоксинів з мембранними білковими структурами нейронів ссавців активно вивчається із середини минулого століття, але, незважаючи на давність проблеми, об'єм досліджень з року в рік лише зростає. Найбільш яскравим результатом пошуків у цьому напрямку є тетродотоксин, блокатор потенціалкерованих натрієвих каналів. Молекулу тетродотоксину було відкрито у 1909 р. японським вченим Йошизумі Тахара, хоча факт отруєння цією сполукою вперше було зафіксовано капітаном Джеймсом Куком ще 1769 р. У 70-х роках минулого сторіччя тетродотоксин синтезували та встановили молекулярний механізм його дії. Після цього було знайдено інші токсини, що

здатні впливати на іонні канали. Такі знахідки мають значну фундаментальну вагу. Зокрема, було встановлено, що такі токсини, як сакситоксин та μ -конотоксини взаємодіють з сайтом зв'язування тетродотоксину. А відкриття ω -конотоксину GVIA, ω -агатовоксину IVA та кальцісептину (нейротоксичних пептидів з отрути молюска *Conus geographus*, павука *Agelenopsis aperta* та змії *Dendroaspis polylepsis*, відповідно), дало змогу фармакологічно розділити за типами високопорогові потенціалкеровані кальцієві канали.

Відкриття токсинів сприяло поступу не лише у розумінні структури та функціонування каналів, але й дозволило використовувати деякі з них у медичних цілях. Відомо, що потенціалкеровані кальцієві канали N- та P/Q-типу нервової системи беруть участь у процесах, що пов'язані з підвищеною чутливістю до болю. Нещодавно було показано, що анальгетична дія ω -коноксину MVIIA (та його синтетичної похідної – циклотиду) є в 100–1000 разів потужнішою, ніж дія широковідомого анес-

© Г.А. Савченко, А.А. Василевський, К.А. Плужников, Ю.В. Королькова, М.В. Маменко, Т.М. Волкова, О.П. Максимюк, Я.А. Бойчук, Є.В. Грішин, О.О. Кришталь

тетика морфіну [13]. Знеболення викликане MVIIA чи циклонотидом позбавлене цілого спектра побічних ефектів, які є неодмінними супутниками опіюєдних препаратів. На підставі цього, у 2004 р. Адміністрацією Продуктів і Ліків США (U.S. FDA), а у 2005 р. Єврокомісія, затвердили використання ПріалтуТ як знеболювального препарату для інтратекального введення. Сучасна фармакологічна промисловість потребує специфічних токсинів до лігандкерованих іонних каналів чи не більше, ніж токсинів до потенціалкерованих каналів. Прикладом того можуть бути рН-керовані канали. Групою корейських учених було встановлено, що рН-керовані катіонні канали ASIC1a є основною причиною ішемічного ушкодження при інсульті, крім того, терапевтичне часове вікно застосування антагоністів ASIC1a рецепторів у декілька разів більше за відповідне вікно для антагоністів глутаматних рецепторів [12, 14]. За кілька років до того, у 2000 р., було відкрито специфічний токсин до рН-керованих катіонних каналів ASIC1a – псалмотоксин [6]. Цей токсин було виділено з отрути павука *Psalmoroeus cambridgei*.

Близько 30 років тому було повідомлено про те, що аденозинтрифосфат (АТФ) викликає відчуття болю за умов його прикладання до опікового пухиря у людей [1, 4]. З того часу було проведено багато досліджень і знайдено низку модуляторів цього больового шляху [2, 5, 9, 10]. Проте всі відомі наразі молекули, що специфічно модулюють P2X-рецептори, є лише хімічними аналогами молекули АТФ та мають високі робочі концентрації. Наша робота присвячена пошуку природних пептидів, що надалі можуть стати прообразами потужних специфічних лігандів до P2X-рецепторів.

МЕТОДИКА

Фракціонування отрути павука Geolycosa sp.
Неочищена отрута павуків *Geolycosa* sp.

була надана компанією Fauna Laboratories, Ltd. (Казахстан). Ліофілізовану отруту (25 мкл) розчиняли у 100 мкл 30 ммоль/л NaF (рН 5,2), що містив 150 ммоль/л NaCl. Розчин завантажували в колонку TSK 2000SW (7,5 x 600 мм, “Beckman”, Японія) для гель-фільтрації і промивали з тим самим буфером зі швидкістю 0,5 мл/хв. Отримані фракції, що модулювали АТФ-індуковані струми, надалі розділяли використовуючи метод зворотнофазової хроматографії на колонці Jupiter C5 (4,6 x 150 мм, “Phenomenex”, США) з градієнтом концентрацій ацетонитрилу у 0,1%-й трифлуороацетовій кислоті 0–40 % за 60 хв, 40–65 % за 10 хв. Концентрацію пептидних компонентів у зразках оцінювали за спектром поглинання у УФ-діапазоні з використанням наближеної формули для розрахунку концентрації білків з невідомою амінокислотою послідовністю: $C = (1,55A_{280} - 0,76A_{260})/5000$, де C – концентрація пептидів, моль/л, A_{280} та A_{260} – оптична густина розчину при 280 та 260 нм відповідно, 5000 – прийнята середня молекулярна маса пептидних компонентів отрути.

Виділення нейронів. У дослідженнях використовували білі щури лінії Вістар WAG/GSto віком від 9 до 12 діб. Тварин утримували на стандартній лабораторній дієті у віварії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Після декапітації у них розрізали спинномозковий канал і виймали спинний мозок. Задньокорінцеві ганглії швидко переносили у чашку Петрі з фізіологічним розчином у складі (ммоль/л): NaCl – 130, KCl – 5, MgCl₂ – 2, CaCl₂ – 2, NEPES/NaOH – 20, рН 7,4. Після цього ганглії переносили у камеру з розчином на фосфатному буфері із 0,3 % трипсину та 0,1 % колагенази для ферментативної обробки, в якому витримували у термостаті 30 хв при 32° С. Після обробки ганглії швидко переносили у фізіологічний розчин, де промивали протягом 2 хв. Потім ганглії за допомогою двох голок піддавали легкій механічній дисоціації під мікроскопом. Така процедура

призводила до розриву зовнішньої оболонки гангліїв та до виділення поодиноких клітин. Отримані клітини використовували впродовж 3–8 год після виділення.

Електрофізіологічні дослідження. Вимірювання струмів проводили за методом фіксації потенціалу в режимі відведення від цілої клітини (whole cell patch-clamp) [8]. Р2Х-опосередковані струми викликали прикладанням 10 мкмоль/л АТФ [11], окрім спеціально зазначених випадків. Струми реєстрували за підтримуваного потенціалу у -60 мВ. Скляні мікропіпетки (опір 2–3 МОм) заповнювали розчином, що містив (ммоль/л): KF – 120; тріс-С1 – 20 (рН доводили до значення 7,2 за допомогою КОН). Фізіологічний розчин наведеного вище складу використовували як зовнішньоклітинний. Експерименти проводили за кімнатної температури. Всі хімічні реагенти, що використовувалися під час експериментів, вироблені компанією “Sigma”

(США). Концентрація активного пептидного компонента в розчинах, які прикладали до клітин становила близько 10 нмоль/л.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Неочищена отрута *Geolycosa* sp. модулювала АТФ-активовані струми. За допомогою гель-фільтрації отруту було розділено на шість фракцій, дві з яких (I та II) були здатні впливати на АТФ-індуковані струми. Фракції I та II, що відповідали місцю елюції поліпептидних компонентів отрути, надалі було розділено за допомогою зворотнo-фазової хроматографії на 18 дрібніших фракцій (по 9 з I та II), вплив яких на Р2Х-опосередковані струми (рис. 1) і був предметом дослідження у нашій роботі. Пептидну природу отриманих речовин підтверджували виміряними молекулярними масами, спектрами поглинання в УФ-діапазоні, а також при аналізі хімічної структури

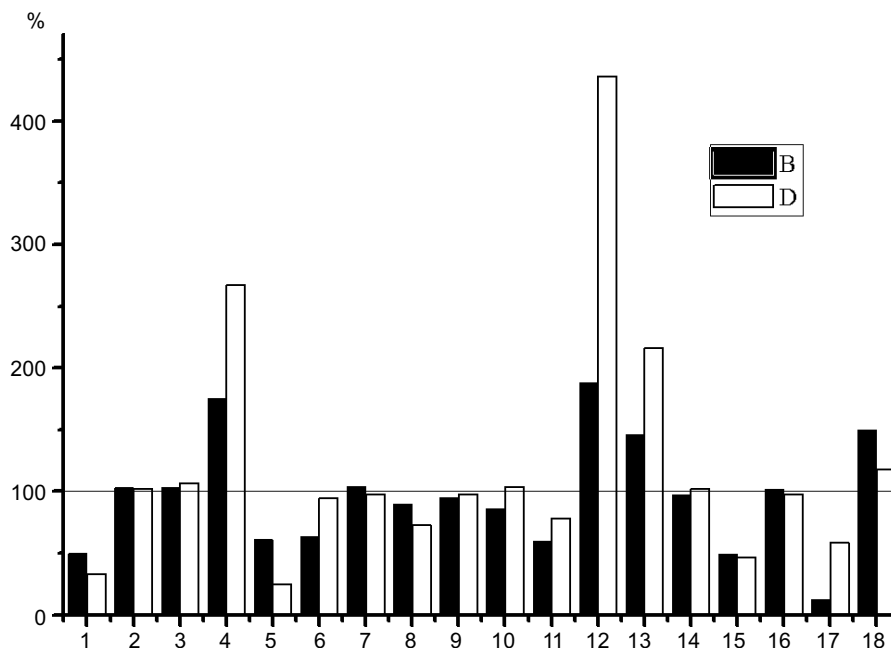


Рис. 1. Вплив різних фракцій отрути павука *Geolycosa* sp. на активність АТФ-активованих струмів задньокорінцевих нейронів щурів. Концентрація пептидної фракції у позаклітинному середовищі становила близько 10 нмоль/л. Відсоткові значення показують відношення амплітуди сумарного АТФ-активованого струму під дією вказаних фракцій отрути до контрольного амплітудного значення (n=3–5). А – дія фракції отрути, В – відмивка. Фракції: 1 – I-1, 2 – I-2, 3 – I-3, 4 – II-2, 5 – II-6, 6 – II-8, 7 – I-8, 8 – I-9, 9 – I-4, 10 – II-3, 11 – II-1, 12 – I-5, 13 – II-7, 14 – I-6, 15 – I-6', 16 – I-7, 17 – I, 18 – I*

методами секвенування за Едманом і фрагментування поліпептидного ланцюжка (результати не наведено).

Ефект фракцій отрути *Geolycosa* sp. Фракція II-1 незворотно пригнічувала P2X-опосередковані струми. Фракція II-3 зворотно блокувала швидку компоненту P2X-струму з потенціацією після усунення речовини з розчину та незворотно – повільну компоненту. Збільшення амплітуди струму після усунення впливу фракції, може свідчити про складний механізм дієзалежності або про ліпофільність сполук, що входять до складу фракції. Подібний ефект міг бути наслідком дії фракції на вихід каналу з десенситизації [3]. Фракція II-6 незворотно пригнічувала P2X-опосередкований струм, причому як швидку, так і повільну його компоненти. Фракція II-7 викликала зворотне збільшення P2X-опосередкованого струму. Слід відмітити, що після усунення її з зовнішньоклітинного розчину викликаний ефект посилювався.

Після кількох прикладань агоніста (АТФ) без зазначеної фракції, амплітуда АТФ-опосередкованого струму поверталася до рівня контролю. Отже, можна припустити, що діюча сполука цієї фракції має ліпофільну природу й сайти зв'язування її з рецептором знаходяться не на поверхні мембрани, а в середині ліпідного шару. Фракція II-7 потенціювала лише швидку компоненту струму. Фракція II-8 значно та незворотно зменшувала амплітуди як повільної, так і швидкої компоненти P2X-опосередкованих струмів, що також призводило до повільного та незворотного збільшення струму витoku.

Додавання фракції I-1 спричиняло значне збільшення струму витoku, різке зменшення P2X-струму, та призводило до загибелі клітини. Ймовірно, що ця фракція діяла безпосередньо на структуру мембрани. Фракція I-2 незначно зменшувала амплітуду повільної складової АТФ-індукованого струму. Фракція II-2 потенціювала швидку компоненту струму і пригнічувала

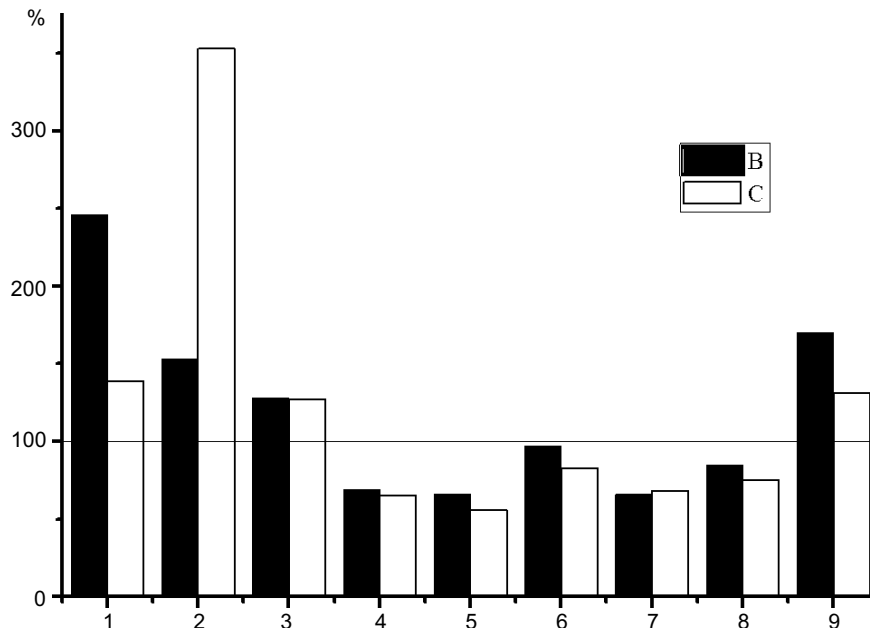


Рис. 2. Вплив окремих пептидів із вибраних активних фракцій отрути павука *Gelycosa* sp. на активність АТФ-активовані струми задньокорінцевих нейронів шурів. Концентрація пептидів становила близько 10 нмоль/л у всіх випадках. Відсоткові значення показують відношення амплітуди сумарного АТФ-активованого струму під дією вказаних пептидів до контрольного амплітудного значення (n=3–5). А – дія пептиду, В – відмивка. Рекombінантні пептиди: 1 – lsp13, 2 – lsp14, 3 – lsp315, 4 – lsp33, 5 – lsp331expr1, 6 – lsp331expr2, 7 – lsp331expr3, 8 – lsp331exprExt, 9 – lsp331exprInt

повільну компоненту.

Вторинне фракціонування. На основі отриманих результатів, для подальшого розділення на окремі пептиди обрали фракції I-5 та I-1, які проявили значний потенціуючий та блокувальний впливи на P2X-опосередковані струми, відповідно; а також фракцію II-6, яка виявилась активним інгібітором АТФ-активованих струмів.

Обрані активні фракції пройшли подальше очищення та модифікації, які були спрямовані, в першу чергу, на виділення з вищезгаданих фракцій пептидів у чистому вигляді (рис.2). Також значна увага приділялася стабілізації пептидних молекул у водно-сольових розчинах. Оскільки природні пептиди є дуже нестійкими і швидко змінюють свою конформацію за стандартних умов експерименту, до їх структури вводяться певні стабілізуючі групи, що значно подовжують період їх напівжиття.

З фракції I-5 було отримано пептид Lsp 33, який незворотно пригнічував P2X-опосередковані струми.

У амінокислотній послідовності Lsp 33 було зроблено дві заміни у функціонально несуттєвих ділянках. Новий продукт названо – Lsp 331expr. Lsp 331expr мав більший вплив на P2X-опосередковані струми. Як і у випадку попередника, дія Lsp 331expr була незворотною.

Для дослідження було також отримано дві модифіковані версії Lsp 331expr: Lsp 331expr-int та Lsp 331expr-ext. Lsp 331expr-ext слабо пригнічував швидкий компонент АТФ-струму. У всіх випадках дія була незворотною. Вплив Lsp 331expr-int на швидку компоненту P2X-опосередкованого струму мав пригнічувальний характер незначний за силою.

З фракції I-1 було виділено пептиди Lsp 315, Lsp 13 та Lsp 14. Пептид Lsp 315 спричинював як збільшення, так і зменшення амплітуди P2X-опосередкованого струму. Пептид Lsp 13 значно (на 145 %) потенціував АТФ-опосередковані струми.

Дія його була зворотною. Пептид Lsp 14 мав складну потенціуючу дію на P2X-опосередковані струми. Аплікація пептиду призводила до незначного збільшення амплітуди струму. Відмивання ж пептиду збільшувало його потенціувальний вплив.

ОБГОВОРЕННЯ

Результати наших електрофізіологічних досліджень демонструють, що деякі компоненти токсину *Geolycosa* sp. модулюють P2X-опосередковані струми в межах від кількох відсотків до 250% від контрольної амплітуди. Статистично значимих змін кінетики струмів у жодному випадку не спостерігалось. Такий тип впливу на P2X-опосередковані струми цього ряду пептидів кардинально відрізняється від впливу інших пептидів з іншої фракції цієї отрути на кальцієві канали, коли пептид щ-Lsp-IA сповільнював кінетику активації кальцієвих каналів на нейронах Пуркін'є [7]. Така різниця у механізмі впливу пептидів з однієї фракції на роботу іонних каналів і низька діюча концентрація свідчать на користь високої специфічності дії цих пептидів. У результаті проведених досліджень з усіх протестованих пептидів для подальшої модифікації відібрано пептидні компоненти, що умовно позначені у цій роботі I-1 та I-5. Ці пептиди є досить потужними модуляторами P2X-опосередкованих струмів і дія їх є повністю зворотною.

Ці дослідження були підтримані спільним грантом РФФД та НАН України.

**G.A.Savchenko, A.A.Vassilevski,
K.A.Pluzhnikov, Y.V.Korolkova, M.V.Mamenko,
T.M.Volkova, O.P.Maximyuk, Ya.A.Boychuk,
E.V.Grishin, O.O.Krishtal**

PEPTIDE COMPONENTS OF LYCOSA SPIDER VENOM MODULATE P2X RECEPTOR ACTIVITY OF RAT DRG NEURONS

Almost each natural venom comprises a considerable combinatorial library of bioactive substances that have been optimized during evolution. Particular attention is devoted

currently on a search for new modulators of ion channels from the venoms of arthropods. We have studied the effect of peptidous compounds of the *Lycosa* spider venom on the activity of P2X receptors in DRG neurons of rats. As a result, at least 7 proteins modulating various P2X receptor-operated ionic currents in the sensory neurons of rats have been found.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy Sciences of Ukraine, Kyiv;
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Russia;
International Center of Molecular Physiology National Academy Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Bleehen T., Keele C. A. Observations on the algogenic actions of adenosine compounds on the human blister base preparation // *Pain*. – 1977. – **3**, № 4. – P. 367–377.
2. Burnstock G. Purinergic signalling: past, present and future // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2008.
3. Chen X., Kalbacher H., Grunder S. Interaction of acid-sensing ion channel (ASIC) 1 with the tarantula toxin psalmotoxin 1 is state dependent // *J. Gen. Physiol.* – 2006. – **127**, № 3. – P. 267–276.
4. Collier H. O., James G. W., Schneider C. Antagonism by aspirin and fenamates of bronchoconstriction and nociception induced by adenosine-5'-triphosphate // *Nature*. – 1966. – **212**, № 5060. – P. 411–412.
5. De Roo M., Rodeau J. L., Schlichter R. Dehydroepiandrosterone potentiates native ionotropic ATP receptors containing the P2X2 subunit in rat sensory neurons // *J. Physiol.* – 2003. – **552**, № Pt 1. – P. 59–71.
6. Escoubas P., De Weille, Jr., Lecoq A. et al. Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**, № 33. – P. 25116–25121.
7. Fisyunov A., Pluzhnikov K., Molyavka A. et al. Novel spider toxin slows down the activation kinetics of P-type Ca²⁺ channels in Purkinje neurons of rat // *Toxicology*. – 2005. – **207**, № 1. – P. 129–136.
8. Hamill O. P., Marty A., Neher E. et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches // *Pflug. Arch.* – 1981. – **391**, № 2. – P. 85–100.
9. Jarvis M. F., Wismer C. T., Schweitzer E. et al. Modulation of BzATP and formalin induced nociception: attenuation by the P2X receptor antagonist, TNP-ATP and enhancement by the P2X(3) allosteric modulator, cibatron blue // *Brit. J. Pharmacol.* – 2001. – **132**, № 1. – P. 259–269.
10. Lalo U. V., Pankratov Y. V., Arndts D. et al. Omega-conotoxin GVIA potently inhibits the currents mediated by P2X receptors in rat DRG neurons // *Brain Res. Bull.* – 2001. – **54**, № 5. – P. 507–512.
11. Pankratov YuV, Lalo U. V., Dashkin A. N. et al. Heterogeneity of the functional expression of P2X3 and P2X2/3 receptors in the primary nociceptive neurons of rat // *Neurochem. Res.* – 2001. – **26**, № 8–9. – P. 993–1000.
12. Pignataro G., Simon R. P., Xiong Z. G. Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia // *Brain*. – 2007. – **130**, № Pt 1. – P. 151–158.
13. Staats P. S., Yearwood T., Charapata S. G. et al. Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: a randomized controlled trial // *JAMA*. – 2004. – **291**, № 1. – P. 63–70.
14. Xiong Z. G., Zhu X. M., Chu X. P. et al. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels // *Cell*. – 2004. – **118**, № 6. – P. 687–698.

Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;
Ин-т биоорган. химии им. акад. М.М. Шемакина та Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва;
Міжнар. центр молекул. фізіології НАН України, Київ
Email: bo@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 30.12.2008