

УДК: 577.25 615.212.3

ИЗУЧЕНИЕ TRPV1-КАНАЛОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И ИХ ВЛИЯНИЯ НА ТРЕВОЖНОЕ СОСТОЯНИЕ У МЫШЕЙ ICR

© 2024 г. В. М. Павлов^{1, 2}, А. Ю. Федотова^{1, 2}, Я. А. Андреев³,
В. А. Паликов^{1, 2}, И. А. Дьяченко^{1, 2}

Представлено академиком РАН А. Г. Габибовым

Поступило 04.04.2024 г.

После доработки 15.05.2024 г.

Принято к публикации 17.05.2024 г.

Канал TRPV1 играет важную роль в различных структурах нервной системы, включая периферические и центральные нейроны, сенсорные ганглии, спинной мозг и различные участки головного мозга. Он участвует в различных нейрональных процессах, таких как восприятие и передача болевых сигналов. TRPV1 как детектор потенциально опасных сигналов может оказывать существенное влияние на реакции организма на стресс. Подавление активности TRPV1 приводит к уменьшению уровня тревожности у животных, что свидетельствует о участии этого канала в психоэмоциональной регуляции. Пептид АРНСЗ является высокоэффективным антагонистом канала TRPV1. В ходе данного исследования мы показали, что данный пептид обладает выраженным анксиолитическим эффектом, снижая уровень тревожности у исследуемых животных.

Ключевые слова: TRPV1, АРНСЗ, анксиолитическое действие, мыши ICR, in vivo

DOI: 10.31857/S2686738924050145

ВВЕДЕНИЕ

Канал TRPV1 (ранее известный как ваниллоидный рецептор 1) играет важную роль в ощущении боли и передаче сенсорной информации. TRPV1 воспринимает различные стимулы, такие как высокая температура, капсаицин и изменение pH. Активация TRPV1 приводит к открытию поры канала, что инициирует передачу сигнала и приводит к различным физиологическим эффектам. TRPV1 обнаруживается в телах нейронов, дендритах, астроцитах и перичитах [1]. Полимодальные свойства TRPV1, позволяющие ему реагировать на разнообразные раздражители, а также его взаимодействие с другими рецепторами и каналами, предполагают его возможную роль в реакциях тревожности и стресса.

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Московская область, Пущино, Россия

²Пущинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пущино, Россия

³Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия
e-mail: v.m.pavlov29@gmail.com

Присутствие канала TRPV1 в клетках центральной нервной системы указывает на функции, которые могут быть связаны не только с восприятием и передачей сенсорной информации [2].

Сама по себе тревожность — мультимодальный феномен и может быть вызвана факторами различной этиологии, такими как стресс, гормональные изменения, генетические факторы и хронические заболевания. Эти факторы приводят к появлению стресс-реакций, что в свою очередь может вызвать разнообразные патологические изменения в организме. Одно из таких изменений это выработка провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-1 β , TNF- α) [3]. Некоторые исследования показали, что TRPV1 экспрессируется в микроглии в ответ на раздражители, что приводит к увеличению выделения провоспалительных цитокинов данными клетками. [4, 5]. Ингибирование TRPV1 в ЦНС при помощи инъекции антагониста этого канала в медиальную префронтальную кору приводит к уменьшению тревоги у крыс [6]. Мыши нокаутные по гену TRPV1 проявляют меньше тревожности и уменьшенные реакции на страх, которые связаны с уменьшением долгосрочной потенциации, что подтверждает связь между TRPV1 и развитием страха [7, 8]. В этом исследовании мы анализировали эффективность АРНСЗ (пептидного

антагониста TRPV1) на моделях острого стресса, таких как помещение животного на приподнятый крестообразный лабиринт и в установку светлая/темная-камера [9]. Пептид АРНСЗ, исходно был выделен из морской анемоны *Heteractis crispa*, как антагонист TRPV1 канала [10, 11]. Было показано, что введение пептида АРНСЗ оказывает противовоспалительный и анальгетический эффект на моделях ревматоидного и остеоартрита, острой боли и хронической боли [10–13]. Также данный пептид обладает нейропротективной активностью в исследовании на клеточных моделях нейродегенерации [14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований использовался пептид АРНСЗ, полученный гетерологической экспрессией в *E.coli* [15].

Исследование проведено на базе лаборатории биологических испытаний Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. В основе дизайна исследования лежали рекомендации “Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств” [16]. Для проведения исследования было взято 80 самцов мышей белых половозрелых мышей аутбредной линии ICR статуса SPF 20–30 граммов, возраст 7–8 недель (НПП Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН). Все процедуры были одобрены комиссией ФИБХ РАН по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных (протокол-заявка № 891/22).

Все животные были разделены на 5 групп по 16 животных в соответствии с вводимыми препаратами. Всем группам животных тестируемые препараты вводились внутримышечно в объеме 2 мл/кг. Животным из группы 1 вводили физраствор (0,9% NaCl, «Обновление», Россия). Животные из групп 2–4 получали пептид АРНСЗ в дозах 0,01 мг/кг, 0,1 мг/кг и 1 мг/кг соответственно. Дозы для пептида были выбраны исходя из ранее опубликованных исследований по изучению анальгетической и противовоспалительной активности [10–13]. Пятой группе был введен препарат сравнения Афобазол® в дозе 2,4 мг/кг. Данная доза выбрана после пересчета эффективной дозы 30 мг/сут для человека. В каждой группе 8 животных подвергнуты тесту приподнятого крестообразного лабиринта, а другие 8 были использованы в тесте светлой/темной-камеры. Все функциональные тесты проводились через 30 минут после введения веществ.

В качестве поведенческих тестов были использованы тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» и тестирование в светлой/темной-камере. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

основан на инстинктивном предпочтении грызунами темных нор, естественного страха нахождения на открытых площадках и падения с высоты. К регистрируемым в “Приподнятом крестообразном лабиринте” показателям уровня тревожности относились число выходов и длительность пребывания животных в открытых рукавах (“открытые” выходы), а также соотношение времени и количества выходов в открытые и закрытые рукава.

Методика светлой/темной-камеры установки TSE Multiconditioning System (TSE Systems, Германия) также использует естественное стремление грызунов избегать ярко освещенных мест. Животных помещали в ярко освещенный отсек двухкамерной светло-темной установки и за 5 мин регистрировали число переходов между светлым и темным отсеками, длительность пребывания в светлом и темном отсеках.

Статистический анализ проводился с использованием GraphPad Prism 6.0 для Windows (GraphPad Software, США). Статистические характеристики представлены средними значениями и стандартными отклонения. Значения были подвергнуты сравнению с использованием непараметрического критерия Kruskal–Wallis с последующим применением критерия множественного сравнения Dunn. Значение $p < 0,05$ считалось показателем статистически значимой разницы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», как и ожидалось, мыши контрольной группы проводили большую часть времени в закрытых зонах лабиринта. Следует отметить, что половина животных не посещала открытые лучи лабиринта. Внутримышечное введение анксиолитического препарата Афобазол® в дозе 2,4 мг/кг приводило к тому, что все мыши посещали открытые рукава лабиринта и проводили в открытых зонах достоверно больше времени (рис. 1). Таким образом, модель адекватна для тестирования анксиолитической активности. Пептид АРНСЗ в дозах 0,01 мг/кг и 1 мг/кг проявил значительную анксиолитическую активность — открытые рукава посещали 75% животных, и они провели в открытых зонах значительно больше времени (рис. 1А). Время пребывания животных в открытых зонах у животных, которые получили дозы 0,01 мг/кг и 1 мг/кг, относительно контрольной группы, увеличивалось на 158,4 и 179,4% соответственно (рис. 1А). Тогда как, взаимодействия мышей с открытыми зонами площадки увеличивалось на 113,9% (доза 0,01 мг/кг) и 110,5% (доза 1 мг/кг) относительно контрольной группы (рис. 1Б). Группа животных, получавших дозу 0,1 мг/кг АРНСЗ, также демонстрировала увеличение времени пребывания в открытых

зонах и взаимодействия с открытыми площадками, однако этот эффект не отличался от результатов контрольной группы, в то же время не наблюдается и статистически значимого отличия от группы животных, получавших афобазол.

Анксиолитический эффект был подтвержден в тесте светлой/темной-камеры. Введение Афобазола® (2,4 мг/кг), 0,01 мг/кг и 1 мг/кг пептида АРНСЗ достоверно увеличивало число переходов животных между отсеками и время нахождения в светлой камере (рис. 2). Афобазол увеличивал время

нахождения в светлой камере, относительно контрольной группы на 15%, тогда как введение АРНСЗ в дозах 0,01 мг/кг и 1 мг/кг на 20% и 30%, соответственно (рис. 2А). Число переходов между отсеками достоверно увеличилось контрольной группы для афобазола на 54%, для АРНСЗ в дозах 0,01 мг/кг и 1 мг/кг на 81% и 56% соответственно (рис. 2Б). Также наблюдалось увеличение времени нахождения в светлой камере для АРНСЗ в дозах 0,01 мг/кг и 1 мг/кг относительно препарата сравнения Афобазол®, но значимых отличий обнаружено не было.

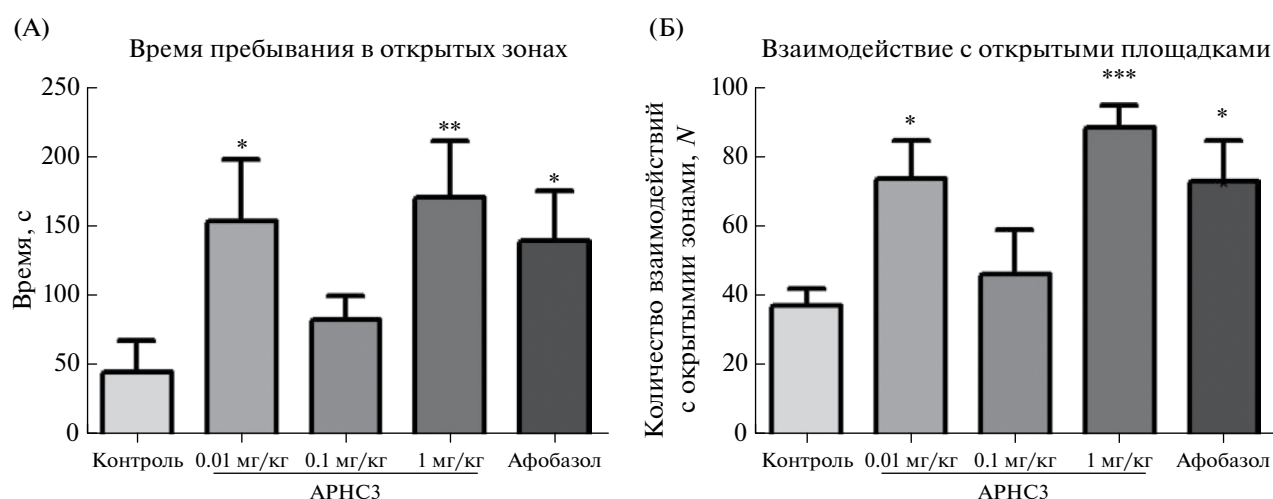


Рис. 1. Результаты теста приподнятого крестообразного лабиринта. Время пребывания в открытых зонах (А) и взаимодействие с открытыми зонами крестообразного лабиринта (Б). Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SD; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ по сравнению с группой контроля. Статистический анализ проводился с использованием критерия Kruskal–Wallis, за которым следовал критерий множественных сравнений Dunn.

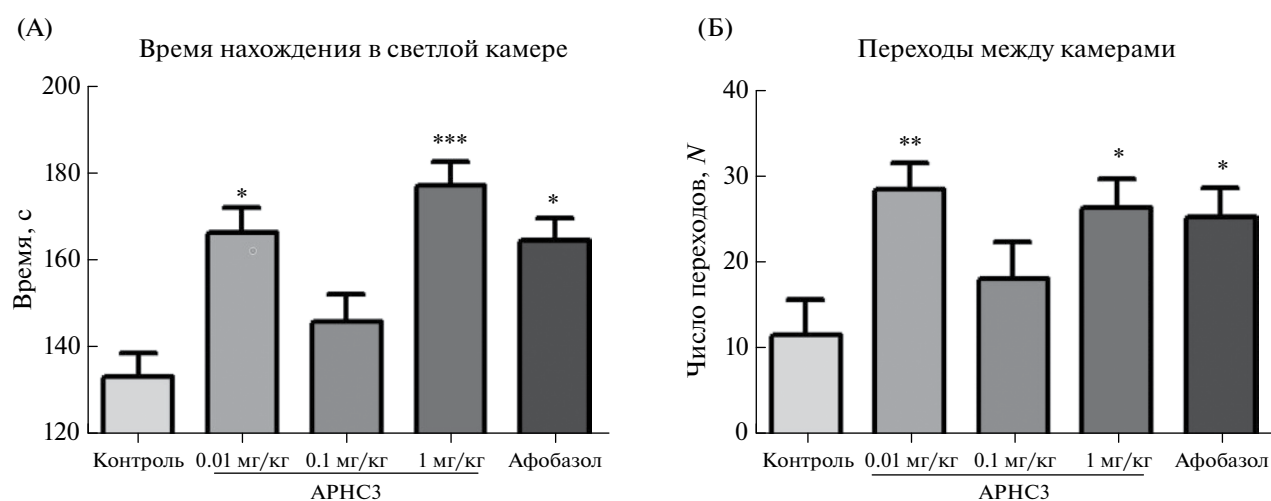


Рис. 2. Результаты теста светлой/темной-камеры. Время нахождения в светлой камере (А), переходы между камерами (Б). Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SD; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ по сравнению с группой контроля. Статистический анализ проводился с использованием критерия Kruskal–Wallis, за которым следовал критерий множественных сравнений Dunn.

Таким образом, пептид АРНСЗ оказывает значительный анксиолитический эффект при внутримышечном введении. В проведенных тестах он проявил себя немного эффективней, чем анксиолитический препарат афобазол. Следовательно, помимо уже известной анальгетической, противоспалительной и нейропротекторной активности можно рассматривать этот пептид как основу для анксиолитических средств. В результате проведенных экспериментов были выявлены эффективные дозы, в которых АРНСЗ обладает выраженным анксиолитическим эффектом, снижая уровень тревожности у животных, что важно для дальнейших исследований пептида в хронических стрессовых состояниях.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета лаборатории биологических испытаний Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных одобрены комиссией ФИБХ РАН по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных (протокол-заявка № 891/22 от 17.05.2022).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Martins, D et al.* "Hotheaded": the role OF TRPV1 in brain functions". // *Neuropharmacology* vol. 85 (2014) P. 151–157.
2. *Ho, Karen W et al.* "TRPV1: a stress response protein in the central nervous system." // *American journal of neurodegenerative disease* vol. 1,1 (2012) P. 1–14.
3. *Nater, Urs M et al.* "Biomarkers of stress in behavioural medicine". // *Current opinion in psychiatry* vol. 26,5 (2013): 440–5.
4. *Marchalant Yannick et al.* "Cannabinoids attenuate the effects of aging upon neuroinflammation and neurogenesis". // *Neurobiology of disease* vol. 34,2 (2009): 300–7.
5. *Marrone Maria Cristina et al.* "TRPV1 channels are critical brain inflammation detectors and neuropathic pain biomarkers in mice." // *Nature communications* vol. 8 15292. 10 May. 2017,
6. *Aguiar Daniele C et al.* "Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats." // *Psychopharmacology* vol. 205,2 (2009) P. 217–225.
7. *Marsch Rudolph et al.* Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. // *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 27,4 (2007) P. 832–839.
8. *Brown Travis E et al.* "Loss of interneuron LTD and attenuated pyramidal cell LTP in Trpv1 and Trpv3 KO mice". // *Hippocampus* vol. 23,8 (2013) P. 662–71.
9. *Atrooz Fatin et al.* "Understanding stress: Insights from rodent models". // *Current research in neurobiology* vol. 2 100013. 23 May. 2021
10. *Andreev Yaroslav A et al.* "Polypeptide modulators of TRPV1 produce analgesia without hyperthermia". // *Marine drugs* vol. 11, 12 P. 5100–5115. 16 Dec. 2013
11. *Kozlov S. A., et al.* "New polypeptide components from the *Heteractis crispa* sea anemone with analgesic activity". // *Russian journal of bioorganic chemistry* 35 (2009) P.711–719.
12. *Logashina Yulia A et al.* "Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of TRPV1 Polypeptide Modulator АРНСЗ in Models of Osteo- and Rheumatoid Arthritis". // *Marine drugs* vol. 19,1 P.39. 17 Jan. 2021
13. *Garami A et al.* "TRPV1 antagonists that cause hypothermia, instead of hyperthermia, in rodents: Compounds' pharmacological profiles, in vivo targets, thermoeffectors recruited and implications for drug development". // *Acta physiologica (Oxford, England)* vol. 223,3 (2018): e13038. doi:10.1111/apha.1303
14. *Kolesova Y.S., Stroylova Y.Y., et al.* "Modulation of TRPV1 and TRPA1 Channels Function by Sea Anemones' Peptides Enhances the Viability of SH-SY5Y Cell Model of Parkinson's Disease". // *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(1):368.
15. *Esipov Roman S. et al.* "Pilot production of the recombinant peptide toxin of *Heteractis crispa* as a potential analgesic by intein-mediated technology". // *Protein expression and purification* vol. 145 (2018): 71–76.
16. *Миронов А.Н. и др.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. // М.: Гриф и К. – 2012. – Т. 944.

THE STUDY OF TRPV1 CHANNELS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND THEIR EFFECT ON ANXIETY IN ICR MICE

V. M. Pavlov^{1, 2}, A. Yu. Fedotova^{1, 2}, Y. A. Andreev³, V. A. Palikov^{1, 2}, I. A. Dyachenko^{1, 2}

¹*Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russian Federation*

²*Pushchino Branch of Russian Biotechnological University, Pushchino, Russian Federation*

³*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russian Federation*

e-mail: v.m.pavlov29@gmail.com

Presented by Academician of the RAS A.G. Gabibov

The TRPV1 channel is actively involved in various neuronal processes and is found in various structures of the nervous system, including peripheral and central neurons, sensory ganglia, spinal cord and various parts of the brain. Due to its ability to respond to various stimuli, TRPV1 can have a significant impact on the body's responses to stress. Studies indicate the involvement of TRPV1 in the regulation of anxiety behavior. Suppression of TRPV1 activity leads to a decrease in the level of anxiety in animals, which indicates the importance of this channel in psychoemotional regulation. A promising compound for inhibiting this channel is the APHC3 peptide, which is a selective receptor antagonist. The results obtained in the course of our study show that this peptide has a pronounced anxiolytic effect, reducing the level of anxiety in the studied animals.

Keywords: TRPV1, APHC3, anxiolytic effect, ICR mice, *in vivo*