

ПОИСК НОВЫХ ЦИКЛОПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ ЦЕНТРАЛЬНЫХ Н-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ХЕМОИНФОРМАТИКИ

Никифоров А.С.¹, Орлова А.Б.,¹ Иванов И.М.¹, Сергеева С.С.², Коновалов А.В.¹,
Неешпапа А.Д.¹, Юдин М.А.¹, Чепур С.В.¹

¹ - *ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, 195043, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4, e-mail: gniiivm_15@mil.ru*

² - *ФГБУН «Институт физиологии им. И.П.Павлова» Российской академии наук, 188680, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский район, Колтушское сельское поселение, село Павлово, ул. Быкова, д. 36 тел. (813)70-72-501, факс (813)70-72-485*

Резюме. Центральные Н-холинорецепторы (нХР) участвуют в осуществлении разнообразных функций центральной нервной системы, вследствие чего они могут служить перспективной биологической мишенью при разработке средств терапии болезни Альцгеймера, шизофрении, болезни Паркинсона и депрессии, эпилепсии и никотиновой зависимости. При этом $\alpha 7$ подтипу нХР отводится важнейшая роль в реализации когнитивных процессов. На модели $\alpha 7$ -нХР проведен ступенчатый виртуальный скрининг библиотек октапептидов, циклизированных через дисульфидную связь, по результатам которого отобраны и наработаны методом твердофазного синтеза соединения-кандидаты с последовательностями VHCHRCYW, RFCRQCRP, FWCEFCEY, EGCHPCRP. Оценку биологической активности октапептидов проводили на батаре тестов (никотиновые судороги у мышей, удержание крыс на решетке, спайковая активность нейрона Ретциуса медицинской пиявки) с использованием методов фармакологического зондирования. У образцов RFCRQCRP и VHCHRCYW была выявлена периферическая Н-холинолитическая активность, сочетавшаяся у последнего также и с

потенциальными центральными холиноблокирующими свойствами. Октапептид EGCHPCPR обладал Н-холиномиметическим действием.

Ключевые слова: холинергическая нейромедиаторная система, Н-холинорецепторы, докинг, виртуальный скрининг, твердофазный синтез пептидов, циклопептиды, фармакологическое зондирование

CHEMOINFORMATICS ASSISTED SEARCH FOR NEW CYCLOPEPTIDE LIGANDS OF CENTRAL N CHOLINORECEPTORS

Nikiforov A.S.¹, Orlova A.B.¹, Ivanov I.M.¹, Sergeeva S.S.², Konovalov A.V.¹,
Neeshpapa A.D.¹, Yudin M.A.¹, Chepur S.V.¹

¹ - FSBI «State Research Testing Institute of Military Medicine» of the Ministry
of Defense of the Russian Federation, 195043, Russia, Saint-Petersburg,
st. Lesoparkovaya, 4, e-mail: gniiivm_15@mil.ru

² - FSBI «Institute of Physiology named after. I.P. Pavlov» of Russian Academy of
Sciences, 188680, Russia, Leningrad region, Vsevolozhsky district, Koltushskoye
rural settlement, Pavlovo village, st. Bykova, 36
tel. (813)70-72-501, fax (813)70-72-485

Abstract. Central H-cholinergic receptors (nAChRs) are involved in a variety of functions of the central nervous system, as a result of which they can serve as a promising biological target in the development of treatments for Alzheimer's disease, schizophrenia, Parkinson's disease and depression, epilepsy and nicotine addiction. At the same time, the alpha7 subtype of nAChR plays a crucial role in the implementation of cognitive processes. Using the alpha7-nAChR model, a stepwise virtual screening of libraries of octapeptides cyclized through a disulfide bond was carried out, based on the results of which candidate compounds with the sequences VHCHRCYW, RFCRQCRP, FWCEFCEY, EGCHPCPR were selected and built by solid-phase synthesis. The biological activity of octapeptides was assessed using a battery of tests (nicotine convulsions in mice, holding rats on a grid, spike activity of the Retzius neuron of a medicinal leech) using pharmacological probing methods. In samples RFCRQCRP and VHCHRCYW, peripheral N-anticholinergic activity was detected, which in the last one was also combined with potential central anticholinergic properties. Octapeptide EGCHPCPR had an N-cholinomimetic properties.

Key words: cholinergic neurotransmitter system, N-cholinergic receptors, docking, virtual screening, solid-phase peptide synthesis, cyclopeptides, pharmacological probing

Введение. Холинергическая иннервация вовлечена в различные физиологические и патологические процессы центральной нервной системы (ЦНС) через мускариновые (мХР) и никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нХР) [1]. Известно, что нХР широко представлены в периферической и центральной нервной системе человека и участвуют в осуществлении разнообразных функций, начиная от когнитивных процессов и заканчивая передачей сигнала в нейромышечном синапсе. Основными подтипами, экспрессирующимся в мозге человека, считают гомомерные $\alpha 7$ -нХР и гетеромерные $\alpha 4\beta 2$ -нХР [2], в отношении которых установлено их участие в патогенезе болезни Альцгеймера, шизофрении, болезни Паркинсона и депрессии [3,4], а также подтверждена их важна роль в формировании никотиновой зависимости и в реализации поведенческих эффектов никотина [5]. В связи с этим эти два подтипа центральных нХР в настоящее время наиболее интенсивно изучаются. В недавних исследованиях показана роль менее изученных подтипов $\alpha 6\beta 2$ в обработке сенсорной информации и восприятии боли [6], а также $\alpha 9$ - в патофизиологии нейропатической боли [7].

Данные о непосредственной вовлеченности подтипов $\alpha 4\beta 2$ - и $\alpha 7$ -нХР в функционирование долговременной и рабочей памяти, а также таких функций высшей нервной деятельности (ВНД), как обучение и внимание [8], подчеркивают перспективность их дальнейшего изучения и поиска новых селективных лигандов с ноотропными и нейрозащитными свойствами. В качестве привлекательных кандидатов для этих целей рассматривают новые высокоселективные природные и синтетические лиганды нХР, в том числе пептидной природы [9], проблему повышения потенциальной биодоступности которых при пероральном введении возможно решить циклизацией структур с образованием дисульфидной связи [10]. В пользу перспективности этого подхода свидетельствует и то, что большинство наиболее активных лигандов нХР природного происхождения, включая эрабутоксин-А, α -бунгаротоксин, d-тубокурарин, стрихнин, конотоксины ImI, PnIA и LvIA, а также токсины из

групп спиролитов, гимнодимитов и пиннатокситов, характеризуются циклической структурой [11].

Поиск новых физиологически активных веществ (ФАВ) с заданными свойствами возможно осуществить с использованием методов хемоинформатики, в основе которых лежит знание о химическом взаимодействии селективных фармзондов с биологической мишенью, путем ступенчатого построения пептидных лигандов [12] и с дальнейшим подтверждением их фармакологических свойств на моделях *in vivo*.

За рубежом в направлении виртуального скрининга новых ФАВ пептидной природы со свойствами лигандов $\alpha 7$ -нХР в последнее время вышло несколько работ, в которых изучали линейные фрагменты амилоидного пептида [13,14,15], гептапептид IQTTWSR ингибитор связывания бета-амилоида [16], линейные пептидные ингибиторы рецептора [17], в том числе олигопептиды длиной 8-12 остатков [18], производные трехпальцевых токсинов [19,20], пептидные лиганды на основе модифицированных конотоксинов [21]. Целью этих работ было изучение особенностей функционирования рецепторов и поиск средств терапии болезни Альцгеймера.

Практическая реализация этого направления требует наличия детализированной трехмерной структуры лиганд-связывающей области $\alpha 7$ -нХР, предпочтительно в комплексе с референтными лигандами, обладающими известной фармакологической активностью.

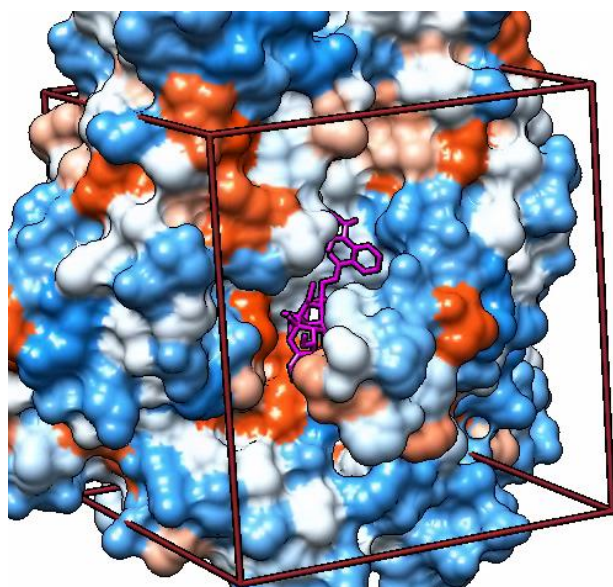
В настоящее время доступны трехмерные модели, полученные методами криоэлектронной микроскопии и рентгенструктурного анализа, человеческого $\alpha 7$ -нХР в комплексе с агонистами никотином (PDB ID 8CAU, 8CI1), эпибатидином (PDB ID 7KOQ, 7KOH, 8UT1, 8UTB, 8UZJ, 8V80, 8V82, 8V88, 8V8A, 8V8C, 8V8D), антагонистами конотоксином (PDB ID 7N43), α -бунгаротоксином (PDB ID 1KC4, 1KL8). Кроме того, доступны мутантные и химерные конструкции на основе ацетил-холин связывающего белка (AChBP), с высокой степенью подобия топологии лиганд-связывающего кармана соответствующему участку человеческих α -нХР, в частности, комплексы с

агонистами эпибатидином (PDB ID 3SQ6), лобелином (PDB ID 5AFK, 5AFH, 5AFJ, 5AFL, 5AFM, 5AFN, 5OUH, 5OUG), антагонистами α -бунгаротоксином (PDB ID 4HQP), метилликаконитином (PDB ID 3SH1).

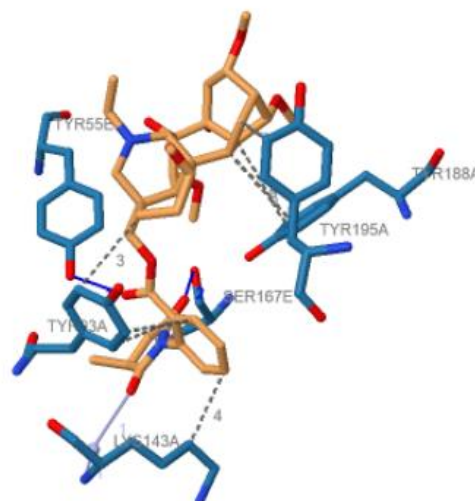
Для проведения скрининга *in silico* была выбрана модель химерного рецептора AChBP, воспроизводящая структуру внеклеточного домена человеческого $\alpha 7$ -нХР в комплексе с антагонистом метилликаконитином (PDB ID 3SH1). Выбор последнего в качестве референтного лиганда основывался на опыте его клинического использования в терапии заболеваний пирамидного и экстрапирамидного характера, сопровождающихся повышением мышечного тонуса и расстройствами двигательных функций, включая пирамидную недостаточность сосудистого и воспалительного происхождения, постэнцефалитический паркинсонизм, болезнь Паркинсона, Литтла и другие.

Цель исследования. С использованием модели взаимодействия метилликаконитина с аналогом гомопентамерного $\alpha 7$ -нХР провести скрининг *in silico* библиотек циклических пептидных лигандов для поиска новых холинотропных соединений с последующим определением их фармакологической активности *in vivo* и *ex vivo*.

Материалы и методы. Докинг осуществляли подготовкой конформационных вариантов нХР, выделением области связывания метилликаконитина с подготовкой конфигурационного файла для AutoDock Vina 1.1.2 с использованием специализированного программного обеспечения (ПО) [22] и уточнением позиций аминокислотных остатков мишени, участвующих во взаимодействии с референтным лигандом, и типов этих взаимодействий при помощи ПО PLIP (рисунок 1) [23].



Координаты центра (x;y;z) и размер области поиска (x;y;z), Å: (6.29;-0.48;-12.3), (39.13;37.34;38.05)



Набор аминокислотных остатков мишени, участвующих во взаимодействии с метилликаконитином :93A, 143A, 188A, 195A, 55E, 167E

Рисунок 1. Графическое отображение карты гидрофобной поверхности мишени и расположенный в кармане связывания лигандов референтный лиганд метилликаконитин, а также схема его взаимодействия с аминокислотными остатками мишени

Генерацию библиотек пептидных лигандов в формате SDF проводили с использованием ПО Bioware CycloPs [24]. Для подготовки макромолекул и пептидных лигандов с последующим их сохранением в формате PDBQT использовали набор утилит MGLTools 1.5.4 [25].

С учетом больших размеров библиотек пептидных лигандов и использованием мишени с предорганизованной к референтному лиганду структурой активного центра использовали режим полугибкого докинга, при котором модель макромолекулы считали ригидной, а лиганд подвижным и способным изменять свою конформацию. Проведение полугибкого докинга осуществляли посредством ПО AutoDock Vina 1.1.2 [26]. Докинг выполняли с параметрами по умолчанию.

Для уменьшения ложноположительных результатов использовали дополнительные показатели, в том числе учитывающие позиции

аминокислотных остатков макромолекулы, участвующих во взаимодействии с исследуемым лигандом, а также тип формирующихся нековалентных связей. Данные об этих взаимодействиях получали при анализе комплексов мишень-лиганд при помощи ПО PLIP [23].

Для ранжирования результатов докинга антагонистов использовали интегрированные характеристики, учитывающий весовые коэффициенты первичных показателей, среднее значение соответствия референтным лигандам («blocker_score»), который рассчитывали по формуле (1):

$$\text{blocker_score} = \text{near} + 0,1 \times \text{missed}, \text{ где:} \quad (1)$$

«near» – количество совпадений в наборе аминокислотных остатков исследуемого и референтного лиганда (%);

«missed» - количество взаимодействий лиганда с мишенью через аминокислотные остатки, не входящие в разрешенный набор (%);

Первичные показатели рассчитывали по формулам 2 и 3:

$$\text{near} = 100 \times N / \text{aminos_ref} \quad (2)$$

$$\text{missed} = 100 \times M / \text{interactions_ref}, \text{ где:} \quad (3)$$

N – число совпадений аминокислотных остатков референтного и исследуемого лиганда;

M – число нековалентных взаимодействий лиганда с мишенью через аминокислотные остатки, не входящие в разрешенный набор;

aminos_ref – число аминокислотных остатков взаимодействующих с референтным лигандом;

interactions_ref - число нековалентных взаимодействий референтного лиганда с мишенью.

В результате докинга пары «мишень-лиганд» получали: наиболее вероятные «позы» докинга (Affinity); минимальное значение Affinity среди всех поз (Affinity.Min); показатель blocker_score для «позы» докинга с минимальным значением Affinity (blocker_score.MinAffinity).

В качестве стартового набора структур для докинга с моделью $\alpha 7$ -нХР была выбрана библиотека циклических пептидных лигандов вида CXXC (где X – это протеиногенные L-аминокислоты) с SS-связью, замыкающей цикл через два цистеиновых остатка.

Отбор лучших лигандов (для формирования библиотек второго уровня вида XCXXCX), проводили на соответствие следующим критериям: Affinity.Min < -7,9 и blocker_score.MinAffinity > 60 %. При отборе пептидов в библиотеках второго уровня критериями принимали: Affinity.Min < -9,0 и blocker_score.MinAffinity > 70 %. При отборе соединений-кандидатов в библиотеках третьего уровня (вида XXCXXCXX) критериями считали: Affinity.Min $\leq$ -10,0 и blocker_score.MinAffinity $\geq$ 90 %. После трехэтапной фильтрации с наращиванием протяженности аминокислотной цепи отобранные циклические октапептиды были наработаны методом твердофазного синтеза для проведения экспериментального скрининга на моделях *in vivo*.

Первичную оценку Н-холинолитической активности пептидов осуществляли в тесте «никотиновые судороги у мышей» [27]. Для этого мышам за 30 мин до подкожного введения никотина в дозе 14 мг/кг выполняли внутривенную инъекцию пептидов в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг. Контрольная группа вместо пептидов получала физиологический раствор. Фиксировали частоту появления судорог, время начала и окончания судорожной активности, а также частоту гибели животных. Критерием наличия Н-холинолитической активности у пептидов служило увеличение латентного периода появления судорог и снижение их продолжительности по сравнению с контрольной группой, в свою очередь, Н-холиномиметической активности - уменьшение латентного периода появления и увеличение продолжительности судорог по сравнению с показателями контрольной группы.

Фармакологическую оценку пептидов в отношении периферических нХР проводили в тесте «удержание на решетке». Методика предназначена для сравнительной оценки специфической активности пептидов по их способности вызывать изменения мышечной силы у белых крыс на фоне воздействия

миорелаксантов. Оценку изменения тонуса мышц осуществляли по времени удержания животного на перевернутой решетке. Для этого за 30 мин до тестирования выполняли внутривенную инъекцию рокурония в дозе 0,5 мг/кг, контрольная группа получала физиологический раствор [28]. Далее через 10 мин экспериментальным группам осуществляли внутривенное введение пептидов в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг. Животное помещали снизу решетки и фиксировали продолжительность времени удержания на ней. Критерием наличия антагонизма пептидов в отношении периферических нХР служило статистически значимое снижение продолжительности времени удержания на решетке по сравнению с группой, которой изолировано вводили миорелаксант.

Влияние пептидов на центральные нХР оценивали по спайковой активности нейрона Ретциуса медицинской пиявки с использованием методов фармакологического зондирования. Методика применима для оценки Н-холинолитической активности в связи со сходством субъединичного состава нХР человека и кольчатых червей [29]. Подготовительный этап включал в себя препарирование медицинской пиявки и извлечение у неё пяти первых ганглиев брюшной нервной цепочки. Второй от головного ганглий подкрашивали 0,01 % раствором нейтрального красного в течение 20-40 мин. В центре ганглия при увеличении $\times 40$ визуализировали нейроны Ретциуса - две крупные клетки диаметром около 100 мкм, к которым устанавливали золотой микроэлектрод в стеклянной изоляции. Выделенную нервную цепочку помещали в систему камер с раствором Рингера для хладнокровных. В первую камеру помещали искомый ганглий, остальную часть цепочки приподнимали из первой камеры и помещали во вторую с вмонтированными биполярными раздражающими электродами, расположенными между третьим и четвертым ганглиями для осуществления контроля проводимости. Критерием проводимости считали регулярную спайковую активность с частотой от 1 до 10 Гц. Запись сигналов микроэлектрода осуществляли через систему биолоэлектрических усилителей и осциллографа при помощи программы «Adobe Audition 1.5».

Далее в течение 20 мин осуществляли экспозицию препаратов: для группы позитивного контроля («никотин») использовали раствор Рингера, для группы негативного контроля вносили раствор 4-аминопиридина («4-аминопиридин+никотин») в концентрации 10^{-3} М, для экспериментальных групп – растворы исследуемых пептидов в концентрациях от 10^{-4} М до 10^{-2} М. Содержимое камеры промывали раствором Рингера и осуществляли капельную аппликацию 10^{-4} М раствора никотина, после чего в течение 1 мин фиксировали электрическую активность нервной цепочки по количеству спайков и изменению их формы. Критерием наличия антагонистической активности пептидов к центральным нХР считали снижение спайковой активности, соотносимое с эффектами 4-аминопиридина.

Статистический анализ выполняли при помощи общепринятых статистических методов пакетов Statistica 10.0, Statistica+ 2005, Excel 2016. Для оценки количественных признаков в сравниваемых группах рассчитывали значения среднего арифметического со стандартной ошибкой среднего ($M \pm m$) и медиан с определением 25 % и 75 % процентилей (Med [Q25; Q75]). Значимость различий межгрупповых величин определяли с помощью критериев Краскела Уоллиса и Манна-Уитни [30]. Значимость межгрупповых различий частот качественных признаков определяли с использованием критерия χ^2 и точного метода Фишера [31]. Ошибку средней величины частоты встречаемости признаков (в процентах) с доверительным интервалом для вероятности 95 % определяли с помощью таблиц В.С. Генеса [32]. Различия сравниваемых показателей считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. По результатам докинга стартовой библиотеки циклопептидов вида CXXC с одной дисульфидной связью было отобрано четыре соединения, конфигурация которых в кармане связывания в наибольшей степени была близка к «позе» референтного лиганда метилликаонитина. На основе отобранных пептидов было сгенерировано четыре библиотеки структур второго уровня вида XCXXCX и выполнен их докинг. В свою очередь по результатам отбора лучших кандидатов были сформированы финальные

библиотеки третьего уровня вида ХХСХХСХХ. Лучшие структуры соединений-кандидатов из библиотек третьего уровня в количестве четырех образцов с высокими показателями предсказанного сродства к мишени были выбраны для твердофазного синтеза и последующей медико-биологической оценки их эффектов. Их интегрированный показатель соответствия референтному лиганду составил $\geq 90\%$, а лучший показатель предсказанного сродства к мишени ≤ -10 ккал/моль (таблица 1).

Таблица 1.

Результаты докинга циклопептидов с моделью $\alpha 7$ -нХР

Пептидные лиганды	Показатели	
	Интегрированный показатель соответствия референтному лиганду, %	Лучший показатель предсказанного сродства к мишени, ккал/моль
Библиотека первого уровня вида СХХ*С		
C ¹ HRC ¹	64,46	-8,33
C ¹ RQC ¹	63,85	-8,00
C ¹ EFC ¹	61,59	-7,95
C ¹ HPC ¹	60,34	-8,85
Библиотека второго уровня вида ХСХХСХ		
HC ¹ HRC ¹ Y	74,0	-9,65
FC ¹ RQC ¹ R	71,8	-9,00
WC ¹ EFC ¹ E	71,7	-9,33
GC ¹ HPC ¹ P	70,2	-9,05
Библиотека третьего уровня вида ХХСХХСХХ		
VHC ¹ HRC ¹ YW	92,6	-10,7
RFC ¹ RQC ¹ RP	93,4	-10,3
FWC ¹ EFC ¹ EY	91,9	-10,1
EGC ¹ HPC ¹ PR	91,7	-10,8
Примечания: ¹ – обозначение внутримолекулярной S-S-связи остатков цистеина * - X - протеиногенные L аминокислоты		

Таким образом, на основе трехэтапной фильтрации с наращиванием протяженности аминокислотной цепи были отобраны структуры четырех циклических октапептидов и наработаны методом твердофазного синтеза для последующего исследования их фармакологической активности *in vivo*.

Первичную оценку наличия Н-холинолитических свойств осуществляли на модели никотиновых судорог у мышей (таблица 2).

Таблица 2.

Показатели Н-холинолитической активности ФАВ пептидной природы на модели никотиновых судорог у мышей (n= 8; Med [Q₂₅; Q₇₅])

Шифр ФАВ	Доза, мг/кг	Латентный период начала судорог, мин	Длительность судорог, мин	Доля животных с развитием судорог, %	Гибель животных, %
контроль	-	1,79 [1,4; 2,24]	2,67 [1,88; 3,13]	100	25±16
FWCEFCY	1	1,88 [1,41; 2,38]	2,47 [2,17; 3,05]	100	25±16
	10	1,94 [1,49; 2,29]	2,72 [2,54; 3,15]	100	13±13
EGCHPCPR	1	1,96 [1,55; 2,21]	2,86 [2,62; 3,76]	100	25±16
	10	0,9 [0,54; 1,22] #	4,24 [3,62; 5] #	100	38±18
VHCHRCYW	1	2,46 [1,05; 2,97]	1,74 [1,59; 2,01]	75±16	0
	10	2,93 [2,42; 3,71] #	0,6 [0,51; 0,72] #	50±19 *	0
RFCRQCRP	1	2,07 [1,57; 2,32]	2,25 [1,58; 2,37]	100	0
	10	2,96 [2,46; 4,42] #	1,3 [0,71; 1,86] #	75±16	0

Примечание - статистически значимые отличия от контрольной группы при p < 0,05;
 # - критерий Mann-Whitney U test;
 * - критерий Chi-square (df=1)

Введение образцов VHCHRCYW и RFCRQCRP в дозе 10 мг/кг приводило к статистически значимому увеличению латентного периода начала судорог (в 1,7 раза) и снижению их продолжительности (в 2-4 раза) по сравнению с контролем. Стоит отметить, что введение обоих образцов позволило избежать гибели животных. Более выраженное Н-холинолитическое действие проявил VHCHRCYW в дозе 10 мг/кг, что обеспечило статистически значимую противосудорожную активность. Образец EGCHPCPR в дозе 10 мг/кг, напротив, способствовал статистически значимому уменьшению латентного периода начала судорог и увеличению их продолжительности до 0,9 мин и 4,24 мин, соответственно, против 1,79 мин и 2,67 мин в контроле, что также может указывать на связь с нХР, но уже с холиномиметическим эффектом. Биологическое действие пептида FWCEFCY на модели никотиновых судорог у мышей не отличалось от показателей группы контроля, что послужило основанием для его исключения из протокола дальнейшего исследования.

Периферическую Н-холинолитическую активность отобранных пептидов подтверждали по эффекту усугубления мышечной слабости, вызванной

введением миорелаксанта рокурония в дозе 0,5 мг/кг («миорелаксант» - позитивный контроль). Результаты влияния исследуемых пептидов в дозе 10 мг/кг в тесте «удержание на решетке» представлены на рисунке 2.

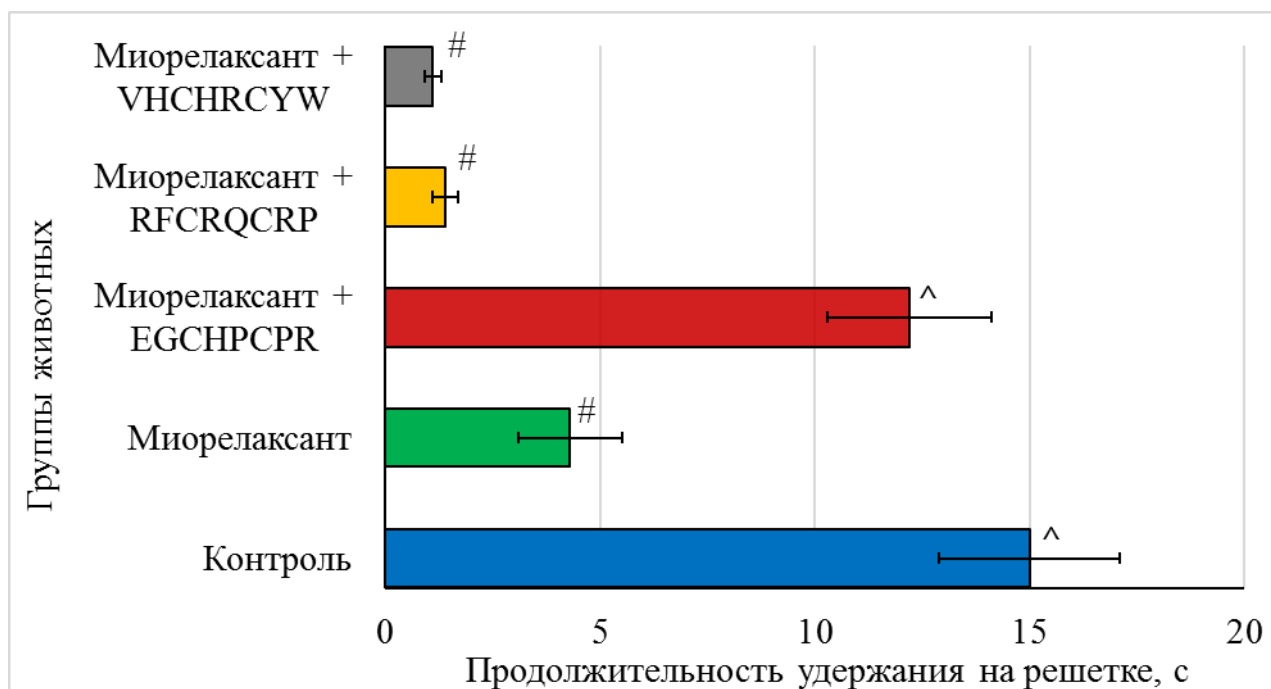


Рисунок 2. Влияние циклопептидов в дозе 10 мг/кг на угнетение продолжительности удержания крыс на решетке, вызванного миорелаксантом (n=6, M±m)

Примечание: «Контроль» – негативный контроль – животные, которым вводили физиологический раствор; «Миорелаксант» – позитивный контроль - группа животных с введением миорелаксанта рокурония в дозе 0,5 мг/кг; «Миорелаксант+ VHCHRCYW» – группа с введением образца VHCHRCYW на фоне действия миорелаксанта; «Миорелаксант+ RFCRQCRP» – группа с введением образца RFCRQCRP на фоне действия миорелаксанта; «Миорелаксант+ EGCHPCRP» – группа с введением образца EGCHPCRP на фоне действия миорелаксанта; # - статистически значимые отличия от контрольной группы при $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney U test); ^ - статистически значимые отличия от группы «Миорелаксант» при $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney U test)

Продолжительность выполнения теста животными из группы, которые получали только миорелаксант (позитивный контроль), составила $4,3 \pm 1,2$ с, что было статистически значимо ниже того же показателя группы животных при введении физиологического раствора (негативный контроль). При воздействии образцов VHCHRCYW и RFCRQCRP после миорелаксанта отмечали ещё большее статистически значимое снижение продолжительности удержания на решетке не только в сравнении с контролем, но и с группой, которой вводили

только рокуроний, что подтверждает наличие у них периферической Н-холинолитической активности. В противоположность им циклопептид EGCHPCPR в дозе 10 мг/кг купировал действие миорелаксанта по снижению продолжительности удержания животных на решетке, показатели теста в этой группе соответствовали значениям негативного контроля, что позволяет предположить наличие у образца периферической Н-холиномиметической активности.

Центральную Н-холинолитическую активность циклопептидных образцов исследовали на нейронах Ретциуса медицинских пиявок. Аппликация 4-аминопиридина предупреждала рост частоты спайковой активности нейрона Ретциуса после внесения в среду раствора никотина и сохраняла её на уровне интактного контроля ($11 \pm 2,1$ в мин) (рисунок 3).

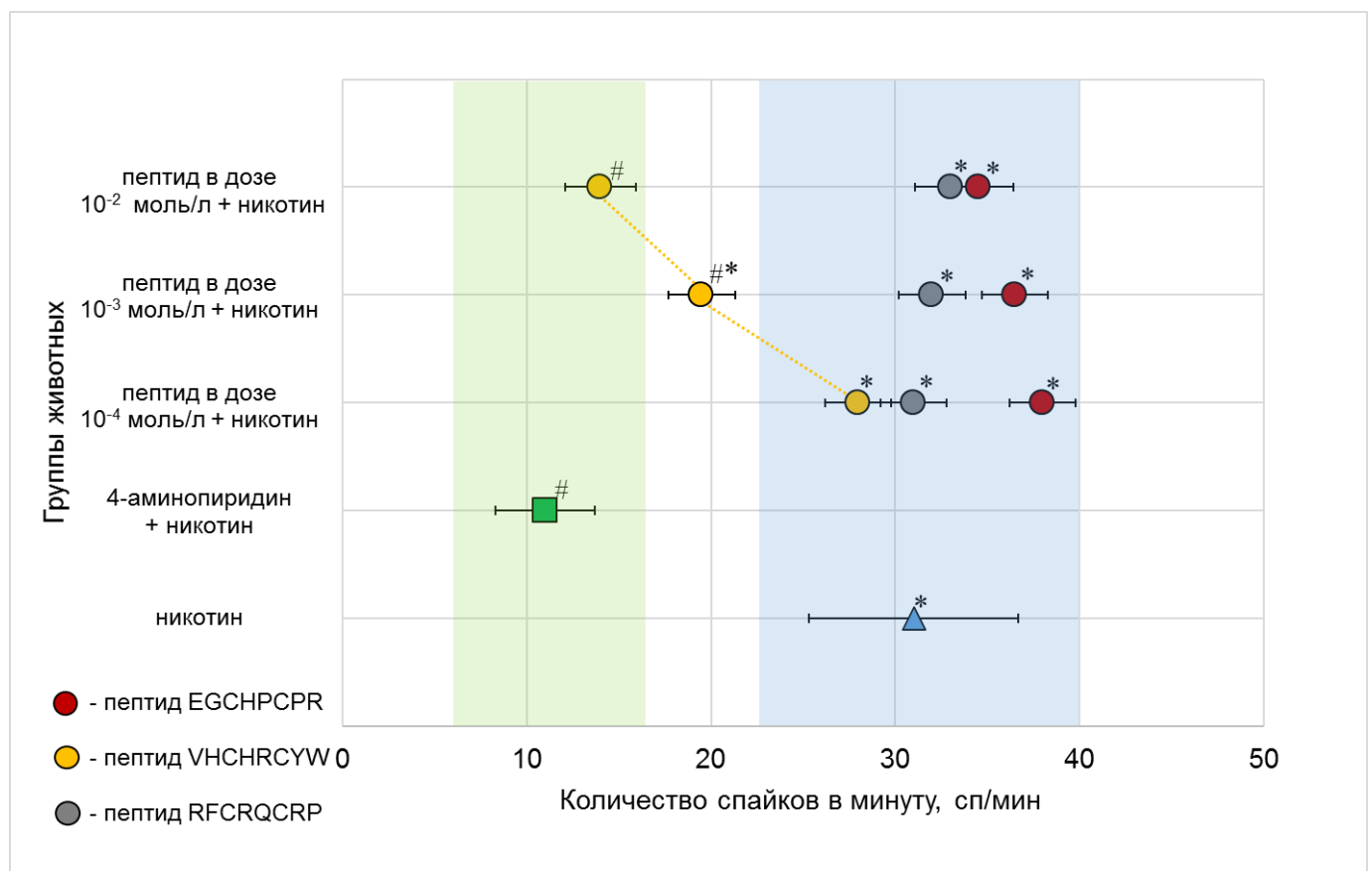


Рисунок 3. Оценка влияния исследуемых пептидов на спайковую активность нейрона Ретциуса с помощью методов фармакологического зондирования

Примечание: «никотин» – группа позитивного контроля; «4-аминопиридин+никотин» – группа негативного контроля с аппликацией 4-аминопиридина в дозе 10^{-3} моль/л; «пептид в дозе 10^{-4} моль/л + никотин», «пептид в дозе 10^{-3} моль/л + никотин», «пептид в дозе 10^{-2} моль/л + никотин» – группы с аппликацией пептидов в

диапазоне концентраций; синим цветом обозначен 99 % диапазон значений группы позитивного контроля; зеленым цветом обозначен 99 % диапазон значений группы негативного контроля; # - статистически значимые отличия от группы позитивного контроля при $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney U test); * - статистически значимые отличия от группы негативного контроля при $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney U test)

При введении в систему раствора VHCHRCYW, начиная с концентрации 10^{-3} моль/л, прослежено статистически значимое дозозависимое снижение спайковой активности нейрона Ретциуса по сравнению с группой, которая получала только аппликацию никотина, а в максимальной исследованной концентрации 10^{-2} моль/л воздействие образца опосредовало получение значений, сопоставимых с негативным контролем (группа «4-аминопиридин + никотин»). В отличие от VHCHRCYW образцы RFCRQCRP и EGCHPCRP не оказывали существенного влияния на спайковую активность нейрона Ретциуса - для них было характерно отсутствие дозовой зависимости и сопоставимые с группой позитивного контроля данные.

Обсуждение результатов. Поиск новых пептидных лигандов, обладающих селективной активностью, с использованием методов хемоинформатики позволяет выявить структуру потенциальных образцов-кандидатов, однако получаемые в результате докинга показатели соответствия референтному лиганду и предсказанных значения аффинности не дают заключения о направленности физиологического эффекта (агонизм/антагонизм) и не позволяют выявить наиболее перспективный образец среди группы предварительно отобранных кандидатов, что актуализирует дальнейшую их проверку методами *in vivo*. Так, образец VHCHRCYW, не обладая наилучшими показателями, проявлял целевую Н-холиноблокирующую активность. Эти показатели целесообразно использовать в качестве критериев отбора перспективных образцов, что согласуется с другими работами по данному направлению [28]. На модели никотиновых судорог наиболее выраженным Н-холинолитическим действием обладал циклопептид VHCHRCYW, который не только статистически значимо увеличивал латентный период начала и снижал длительность судорожной активности, но и обладал противосудорожной активностью в виде снижения доли животных с

судорогами. Это наблюдение позволяет предположить у VHCHRCYW нескольких мишеней противосудорожного действия, например, центральные и периферические нХР, ввиду близости сайтов взаимодействия метилликаконитина и ацетилхолина [9]. Для проверки данного предположения провели оценку воздействия циклопептидов на обе разновидности этих рецепторов. Если на модели оценки периферической Н-холинолитической активности (удерживание на решетке) оба образца VHCHRCYW и RFCRQCRP проявляли антагонизм к рецепторам, то на модели оценки центрального действия (спайковая активность нейрона Ретциуса медицинской пиявки) только VHCHRCYW показывал дозовую Н-холинолитическую зависимость, проявляя свойства неселективного Н-холиноблокатора.

При оценке влияния октациклопептидов в границах реализации электрохимических эффектов спайковой активности нейрона Ретциуса было установлено, что базальная её активность обеспечивалась серотонинергической системой, тогда как воздействие никотина включало в спайковую активность нХР. При воздействии 4-аминопиридина происходила блокада нХР, а спайковая активность нейронов в данном случае была опосредована исключительно функционированием серотониновой нейротрансмиттерной системы (рисунок 4а).

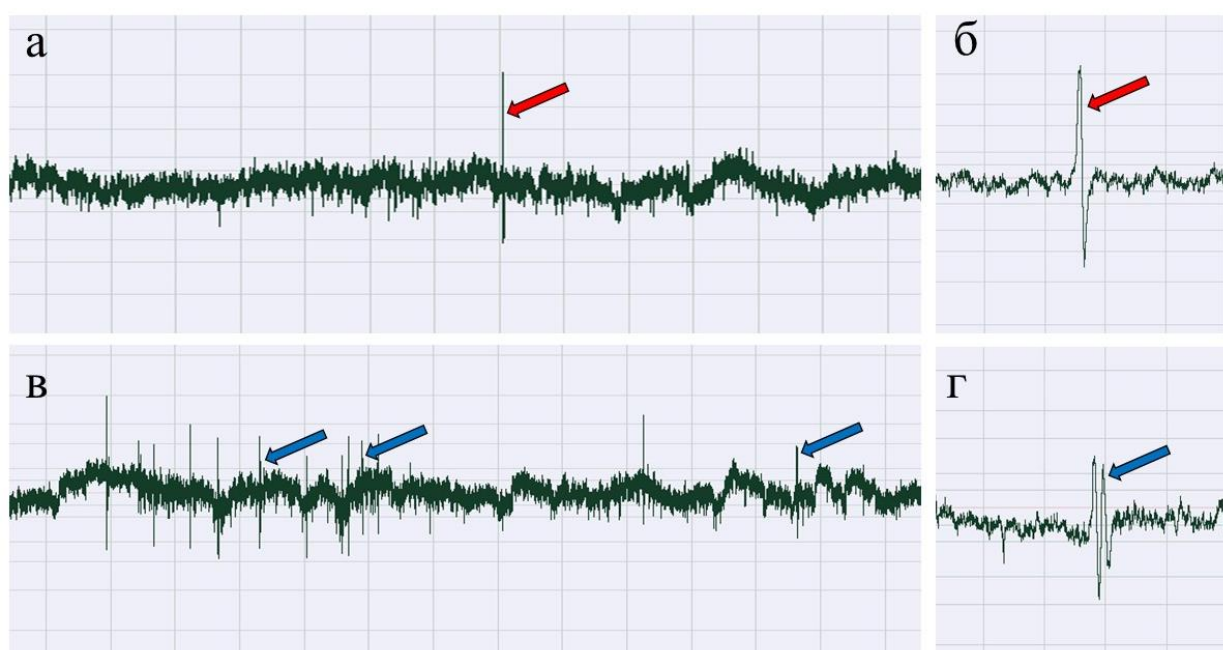


Рисунок 4. Спайковая активность нейрона Ретциуса при воздействии 4-аминопиридина и никотина

Примечание: а – спайковая активность (группа негативного контроля) после аппликации 4-аминопиридина в концентрации 10^{-3} моль/л; б – увеличенный масштаб одиночного спайка группы негативного контроля; в – спайковая активность (группа позитивного контроля) после аппликации никотина в концентрации 10^{-4} моль/л; г – увеличенный масштаб М-образного спайка группы позитивного контроля; красной стрелкой отмечены типичные спайки нейрона Ретциуса; синей стрелкой отмечены М-образные спайки нейрона Ретциуса.

Воздействие никотина приводило к инициированию дополнительного канального механизма, за счет чего частота деполяризаций нейрона Ретциуса в минуту возрастала в три раза по сравнению с контролем (рисунок 4в). При увеличении масштаба графиков было установлено, что воздействие никотина наряду с типичными спайками, представленными на рисунке 4б, определяло М-образные спайки (рисунок 4г), по-видимому, сформированные серотониновыми и никотиновыми механизмами. Их форма, согласно нашему мнению, свидетельствовала о наложении спайков нейрона Ретциуса, генерированных холинергической и серотонинергической системами с разной скоростью формирования потенциала действия за счет различия в реализации рецептороканального механизма (нХР, первый пик) и удлинённой цепи событий при участии G-белка серотониновых рецепторов (второй пик).

Заключение. Таким образом, в результате виртуального скрининга библиотек циклопептидов на модели $\alpha 7$ -нХР отобраны четыре октапептида-кандидата и наработаны методом твердофазного синтеза для дальнейшего исследования *in vitro*, в ходе которого для образцов VHCHRCYW и RFCRQCRP выявлено Н-холинолитическое, а для образца EGCHPCPR – Н-холиномиметическое действие на модели никотиновых судорог у мышей. Периферические Н-холинолитические эффекты VHCHRCYW и RFCRQCRP подтверждены в тесте «удержание на решетке» у крыс, в котором эти октапептиды усугубляли миорелаксирующее действие рокурония, а циклопептид EGCHPCPR подтверждал свойства Н-холиномиметика, нормализуя нарушенный мышечный тонус у животных.

Выявленный в опытах *ex vivo* на нейронах Ретциуса медицинских пиявок отчетливый дозозависимый Н-холинолитический эффект у образца VHCHRCYW позволяет предположить у него наличие потенциальных центральных эффектов, что требует дальнейшего экспериментального подтверждения с применением этологических методик.

Литература.

1. Nickell J.R., Grinevich V.P., Siripurapu K.B. et al. Potential therapeutic uses of mecamylamine and its stereoisomers. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2013; 108: 28-43.
2. Colombo S.F., Mazzo F., Pistillo F., Gotti, C. Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors. *Biochemical pharmacology*. 2013; 86(8): 1063-1073.
3. D'Andrea M.R., Nagele, R.G. Targeting the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor to reduce amyloid accumulation in Alzheimer's disease pyramidal neurons. *Current pharmaceutical design*. 2006; 12(6): 677-684.
4. Olincy A., Harris J.G., Johnson L.L. et al. Proof-of-concept trial of an $\alpha 7$ nicotinic agonist in schizophrenia. *Archives of general psychiatry*. 2006; 63(6): 630-638.
5. Balfour D.J. The neurobiology of tobacco dependence: a preclinical perspective on the role of the dopamine projections to the nucleus. *Nicotine & Tobacco Research*. 2004; 6(6): 899-912.
6. Hone A.J., McIntosh J.M. Nicotinic acetylcholine receptors in neuropathic and inflammatory pain. *FEBS letters*. 2018; 592(7): 1045-1062.
7. Hone A.J., Servent D., McIntosh J.M. $\alpha 9$ -containing nicotinic acetylcholine receptors and the modulation of pain. *British journal of pharmacology*. 2018; 175(11): 1915-1927.

8. Levin E.D., McClernon F.J., Rezvani A.H. Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology*. 2006; 184: 523-539.

9. Спирова Е.Н. *Анализ мышечных и нейрональных никотиновых рецепторов сочетанием кальциевого имиджинга и электрофизиологии*: дис. канд. биол.наук: 03.01.03. Москва, 2019. 118 с.

10. Орлова А.Б., Никифоров А.С., Иванов И.М., Руйпо В.С. Способы химической модификации пептидов для повышения их пероральной биодоступности (обзор литературы). *Medline.ru*. 2023; 24: 1097-1110.

11. Ho T.N., Abraham N., Lewis R.J. Structure-function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor inhibitors derived from natural toxins. *Frontiers in Neuroscience*. 2020; 14: 609005.

12. Jaghoori M.M., Bleijlevens B., Olabarriaga S.D. 1001 Ways to run AutoDock Vina for virtual screening. *Journal of computer-aided molecular design*. 2016; 30(3): 237-249.

13. Espinoza-Fonseca L.M. Molecular docking of four β -amyloid1–42 fragments on the $\alpha 7$ nicotinic receptor: delineating the binding site of the A β peptides. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004; 323(4): 1191-1196.

14. Espinoza-Fonseca L.M. Base docking model of the homomeric $\alpha 7$ nicotinic receptor– β -amyloid1–42 complex. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004; 320(2): 587-591.

15. Gao X., Guan Y., Wang C. et al. Specific interaction from different A β 42 peptide fragments to $\alpha 7$ nAChR-A study of molecular dynamics simulation. *Journal of Molecular Modeling*. 2024; 30(7): 233.

16. Espinoza-Fonseca L.M., Trujillo-Ferrara J.G. Fully flexible docking models of the complex between $\alpha 7$ nicotinic receptor and a potent heptapeptide inhibitor of the β -amyloid peptide binding. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2006; 16(13): 3519-3523.

17. Cao X., Liu T., Wang T. et al. De Novo Screening and Mirror Image Isomerization of Linear Peptides Targeting $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor. *ACS Chemical Biology*. 2024; 19(3): 592-598.
18. Zhang B., Ren M., Yang F. et al. Oligo-basic amino acids, potential nicotinic acetylcholine receptor inhibitors. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022; 152: 113215.
19. Diankin I.D., Kudryavtsev D.S., Zalevsky A.O. et al. New Binding Mode of SLURP Protein to $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Revealed by Computer Simulations. *Supercomputing Frontiers and Innovations*. 2018; 5(4): 73-77.
20. Gulsevin A., Meiler J. An investigation of three-finger toxin—nAChR Interactions through Rosetta protein docking. *Toxins*. 2020; 12(9): 598.
21. Leffler A.E., Kuryatov A., Zebroski H.A. et al. Discovery of peptide ligands through docking and virtual screening at nicotinic acetylcholine receptor homology models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017; 114(38): E8100-E8109.
22. Верецагин В.В., Иванов И.М., Никифоров А.С., Голосов Р.Д. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2022612627 Российская Федерация. *Программа для создания конфигурационного файла для проведения молекулярного докинга в программах на основе Autodock Vina*: № 2022612269: заявл. 18.02.2022: опубл. 28.02.2022.
23. Salentin S., Schreiber S., Haupt V.J. et al. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic acids research*. 2015; 43(W1): W443-W447.
24. Duffy F.J., Verniere M., Devocelle M. et al. CycloPs: generating virtual libraries of cyclized and constrained peptides including nonnatural amino acids. *Journal of chemical information and modeling*. 2011; 51(4): 829-836.

25. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*. 2009; 30(16): 2785-2791.
26. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*. 2010; 31(2): 455-461.
27. Потапкин А.М., Лебедев А.А., Бычков Е.Р. и др. Исследование противосудорожных свойств новых антагонистов глутаматных рецепторов. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2015; 13(2): 3-9.
28. Иванов И.М., Орлова А.Б., Неешпапа А.Д. и др. Поиск циклических пептидных лигандов периферических Н-холинорецепторов при помощи методов хемоинформатики. *Medline.ru*. 2022; 23: 733-747.
29. Burgin A.M., Szczupak L. Basal acetylcholine release in leech ganglia depolarizes neurons through receptors with a nicotinic binding site. *Journal of experimental biology*. 1998; 201(12): 1907-1915.
30. Mann H.B., Whitney D.R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The annals of mathematical statistics*. 1947; 50-60.
31. Corder G.W., Foreman D.I. *Nonparametric Statistics for Non-Statisticians: A Step-by-Step Approach*. New York: Wiley, 2009.
32. Генес В.С. *Таблицы достоверных различий между группами наблюдений по качественным показателям: пособие по статистической обработке результатов наблюдений и опытов в медицине и биологии*. М.: Медицина; 1964.

References

1. Nickell J.R., Grinevich V.P., Siripurapu K.B. et al. Potential therapeutic uses of mecamylamine and its stereoisomers. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2013; 108: 28-43.
2. Colombo S.F., Mazzo F., Pistillo F., Gotti, C. Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors. *Biochemical pharmacology*. 2013; 86(8): 1063-1073.
3. D'Andrea M.R., Nagele, R.G. Targeting the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor to reduce amyloid accumulation in Alzheimer's disease pyramidal neurons. *Current pharmaceutical design*. 2006; 12(6): 677-684.
4. Olincy A., Harris J.G., Johnson L.L. et al. Proof-of-concept trial of an $\alpha 7$ nicotinic agonist in schizophrenia. *Archives of general psychiatry*. 2006; 63(6): 630-638.
5. Balfour D.J. The neurobiology of tobacco dependence: a preclinical perspective on the role of the dopamine projections to the nucleus. *Nicotine & Tobacco Research*. 2004; 6(6): 899-912.
6. Hone A.J., McIntosh J.M. Nicotinic acetylcholine receptors in neuropathic and inflammatory pain. *FEBS letters*. 2018; 592(7): 1045-1062.
7. Hone A.J., Servent D., McIntosh J.M. $\alpha 9$ -containing nicotinic acetylcholine receptors and the modulation of pain. *British journal of pharmacology*. 2018; 175(11): 1915-1927.
8. Levin E.D., McClernon F.J., Rezvani A.H. Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology*. 2006; 184: 523-539.
9. Spirova E.N. *Analiz myshechnyh i nejronal'nyh nikotinovyh receptorov sochetaniem kal'cievogo imidzhinga i jelektrofiziologii*: dis. kand. biol. nauk: 03.01.03. Moskva, 2019. 118 s.
10. Orlova A.B., Nikiforov A.S., Ivanov I.M., Rujpo V.S. Sposoby himicheskoy modifikacii peptidov dlja povyshenija ih peroral'noj biodostupnosti (obzor literatury). *Medline.ru*. 2023; 24: 1097-1110.

11. Ho T.N., Abraham N., Lewis R.J. Structure-function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor inhibitors derived from natural toxins. *Frontiers in Neuroscience*. 2020; 14: 609005.
12. Jaghoori M.M., Bleijlevens B., Olabarriaga S.D. 1001 Ways to run AutoDock Vina for virtual screening. *Journal of computer-aided molecular design*. 2016; 30(3): 237-249.
13. Espinoza-Fonseca L.M. Molecular docking of four β -amyloid1–42 fragments on the $\alpha 7$ nicotinic receptor: delineating the binding site of the A β peptides. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004; 323(4): 1191-1196.
14. Espinoza-Fonseca L.M. Base docking model of the homomeric $\alpha 7$ nicotinic receptor– β -amyloid1–42 complex. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004; 320(2): 587-591.
15. Gao X., Guan Y., Wang C. et al. Specific interaction from different A β 42 peptide fragments to $\alpha 7$ nAChR-A study of molecular dynamics simulation. *Journal of Molecular Modeling*. 2024; 30(7): 233.
16. Espinoza-Fonseca L.M., Trujillo-Ferrara J.G. Fully flexible docking models of the complex between $\alpha 7$ nicotinic receptor and a potent heptapeptide inhibitor of the β -amyloid peptide binding. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2006; 16(13): 3519-3523.
17. Cao X., Liu T., Wang T. et al. De Novo Screening and Mirror Image Isomerization of Linear Peptides Targeting $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor. *ACS Chemical Biology*. 2024; 19(3): 592-598.
18. Zhang B., Ren M., Yang F. et al. Oligo-basic amino acids, potential nicotinic acetylcholine receptor inhibitors. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022; 152: 113215.
19. Diankin I.D., Kudryavtsev D.S., Zalevsky A.O. et al. New Binding Mode of SLURP Protein to $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Revealed by Computer Simulations. *Supercomputing Frontiers and Innovations*. 2018; 5(4): 73-77.

20. Gulsevin A., Meiler J. An investigation of three-finger toxin—nAChR Interactions through Rosetta protein docking. *Toxins*. 2020; 12(9): 598.
21. Leffler A.E., Kuryatov A., Zebroski H.A. et al. Discovery of peptide ligands through docking and virtual screening at nicotinic acetylcholine receptor homology models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017; 114(38): E8100-E8109.
22. Vereshhagin V.V., Ivanov I.M., Nikiforov A.S., Golosov R.D. Svidetel'stvo o gosudarstvennoj registracii programmy dlja JeVM №2022612627 Rossijskaja Federacija. *Programma dlja sozdaniya konfiguracionnogo fajla dlja provedenija molekuljarnogo dokinga v programmah na osnove Autodock Vina: № 2022612269: zajavl. 18.02.2022: opubl. 28.02.2022*.
23. Salentin S., Schreiber S., Haupt V.J. et al. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic acids research*. 2015; 43(W1): W443-W447.
24. Duffy F.J., Verniere M., Devocelle M. et al. CycloPs: generating virtual libraries of cyclized and constrained peptides including nonnatural amino acids. *Journal of chemical information and modeling*. 2011; 51(4): 829-836.
25. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*. 2009; 30(16): 2785-2791.
26. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*. 2010; 31(2): 455-461.
27. Potapkin A.M., Lebedev A.A., Bychkov E.R. i dr. Issledovanie protivosudorozhnyh svojstv novyh antagonistov glutamatnyh receptorov. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoj terapii*. 2015; 13(2): 3-9.
28. Ivanov I.M., Orlova A.B., Neeshpapa A.D. i dr. Poisk ciklicheskih peptidnyh ligandov perifericheskikh N-holinoreceptorov pri pomoshhi metodov hemoinformatiki. *Medline.ru*. 2022; 23: 733-747.

29. Burgin A.M., Szczupak L. Basal acetylcholine release in leech ganglia depolarizes neurons through receptors with a nicotinic binding site. *Journal of experimental biology*. 1998; 201(12): 1907-1915.
30. Mann H.B., Whitney D.R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The annals of mathematical statistics*. 1947; 50-60.
31. Corder G.W., Foreman D.I. *Nonparametric Statistics for Non-Statisticians: A Step-by-Step Approach*. New York: Wiley, 2009.
32. Genes V.S. *Tablicy dostovernyh razlichij mezhdru gruppami nabljudenij po kachestvennym pokazateljam: posobie po statisticheskoj obrabotke rezul'tatov nabljudenij i opytov v medicine i biologii*. M.: Medicina; 1964.