

## ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ МОДУЛЯЦИИ КОРОТКИМИ ПЕПТИДАМИ МЕДЛЕННЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ МЕМБРАНЫ СЕНСОРНОГО НЕЙРОНА

© 2021 г. И.В. Рогачевский, А.Д. Калинина, В.А. Пеннийнен, С.Г. Терехин, С.А. Подзорова, Б.В. Крылов, В.Б. Плахова

*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6*

*E-mail: verapl@mail.ru*

Поступила в редакцию 08.09.2020 г.

После доработки 10.09.2020 г.

Принята к публикации 15.04.2021 г.

Исследованы возможные механизмы лиганд-рецепторного связывания аргининсодержащих тетрапептидов с каналами  $\text{Na}_v1.8$  первичного сенсорного нейрона. Установлено, что тетрапептид Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, действующий с наружной стороны нейрональной мембраны, снижает потенциалочувствительность исследуемых каналов. В отличие от этого тетрапептид Ac-REAR-NH<sub>2</sub> не обладает такой способностью. Применение конформационного анализа для объяснения механизма лиганд-рецепторного связывания ряда коротких пептидов, исследованных нами в настоящей работе, позволило предположить, что ключевую роль здесь играют положительно заряженные гуанидиновые группы боковых цепей двух аргинильных остатков. Между этими остатками должен находиться еще один аминокислотный остаток, в нашем случае — глутаминовая кислота. Расчеты показывают, что механизм лиганд-рецепторного связывания не может быть реализован, когда указанные гуанидиновые группы в молекулах коротких пептидов оказываются на расстоянии, меньшем определенного порогового значения. Полученные данные позволяют заключить, что тетрапептид Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, равно как и ряд других пептидов, способных к связыванию с каналом  $\text{Na}_v1.8$  по тому же механизму, могут претендовать на роль лекарственных субстанций анальгетиков периферического механизма действия.

*Ключевые слова:* короткие пептиды, каналы  $\text{Na}_v1.8$ , ноцицептивный нейрон, конформационный анализ.

DOI: 10.31857/S0006302921040074

Медленные натриевые каналы впервые были обнаружены в мембране сенсорного нейрона [1]. Позже, когда были изучены и другие представители суперсемейства натриевых каналов, этим медленным натриевым каналам было присвоено название  $\text{Na}_v1.8$ . В настоящее время очевидно, что физиологическая функция каналов  $\text{Na}_v1.8$  связана с кодированием периферических ноцицептивных сигналов [1–3].

Ноцицепторы являются полимодальными рецепторами, причем информацию о тактильных, температурных и других воздействиях несет низкочастотная посылка нервных импульсов, а при усилении стимула до повреждающего уровня происходит повышение частоты импульсации, что и является сигналом для активации ноцицептивной системы на супраспинальном уровне. Такая высокочастотная посылка нервных импульсов воспринимается как болевое ощущение [4, 5].

При действии гипералгезических агентов отмечается увеличение функциональной активности каналов  $\text{Na}_v1.8$ . Для получения антиноцицептивного эффекта необходимо снизить функциональную активность этих каналов, что может быть осуществлено двумя способами: или путем уменьшения плотности каналов в мембране ноцицептивного нейрона, или за счет снижения потенциалочувствительности их активационного воротного устройства [3, 6, 7]. Агенты, способные снижать возбудимость ноцицепторов посредством уменьшения потенциалочувствительности активационного воротного устройства медленных натриевых каналов  $\text{Na}_v1.8$ , могут претендовать на роль анальгетических лекарственных субстанций [8].

При изучении низкомолекулярных белков деффенсинов, продуцируемых нейтрофилами и клетками Панета [9, 10], нами было обнаружено, что деффенсины кролика NP-1 и NP-4, действующие в очень низких концентрациях, снижают потенциа-

*Сокращение:* ИП — индекс площади эксплантатов.

лочувствительность каналов  $\text{Na}_v1.8$  сенсорного нейрона [11, 12]. Это свидетельствует о потенциальной способности данных молекул выключать ноцицептивную компоненту сенсорного сигнала, передаваемого в центральную нервную систему. Задача разделения противомикробной (антибиотической) и анальгетической функций этих эндогенных молекул не решена до настоящего времени. Для ее решения нами была предпринята попытка выделить из молекул дефенсина минимальный фрагмент, оказывающий модулирующий эффект на каналы  $\text{Na}_v1.8$ . Выяснилось, что синтетические гексапептиды  $\text{Ac-PRERRA-NH}_2$ ,  $\text{Ac-PRARRA-NH}_2$  и  $\text{Ac-RKEKKA-NH}_2$  снижают потенциалочувствительность каналов  $\text{Na}_v1.8$  в концентрациях, примерно равных 100 нмоль/л [13]. Последовательность  $\text{PRERRA}$  является фрагментом нативной формы молекулы дефенсина NP-1. Замена глутаминовой кислоты на аланин (переход от  $\text{Ac-PRERRA-NH}_2$  к  $\text{Ac-PRARRA-NH}_2$ ) не отразилась на оказываемом пептидом эффекте. Исходя из этого, был сделан вывод, что присутствие в атакующей молекуле аминокислотного остатка глутаминовой кислоты не является необходимым условием, определяющим способность пептида к связыванию с каналом [13]. Таким образом, стало понятно, что ключевую роль в механизме лиганд-рецепторного связывания молекулы  $\text{Ac-PRERRA-NH}_2$  должны играть аргинильные остатки, поэтому следующей задачей стал поиск максимально короткого пептида, содержащего данную аминокислоту и способного эффективно снижать потенциалочувствительность каналов  $\text{Na}_v1.8$ . Все указанные молекулы объединяет присутствие стерически доступных аргинильных остатков, которые вносят основной вклад во взаимодействие с каналом  $\text{Na}_v1.8$  за счет образования межмолекулярных ион-ионных связей [14].

Задачей настоящего исследования было изучение механизма лиганд-рецепторного связывания с каналами  $\text{Na}_v1.8$  вновь синтезированных тетрапептидов  $\text{Ac-REERR-NH}_2$  и  $\text{Ac-REARR-NH}_2$ , которые короче изученных нами ранее гексапептидов и, согласно нашему предположению, могут претендовать на роль безопасной и эффективной субстанции нового анальгетика. При формировании лиганд-рецепторного комплекса указанные тетрапептиды потенциально способны образовывать межмолекулярные ион-ионные связи с участием гуанидиновых функциональных групп аргинильных остатков. Проверке этого предположения посвящена настоящая работа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Метод локальной фиксации потенциала.** Для проведения эксперимента методом локальной фиксации потенциала использовали диссоции-

рованную культуру изолированных нейронов дорзальных ганглиев крыс линии *Wistar*, полученную методом краткосрочного культивирования. Дорзальные ганглии, выделенные из областей  $\text{L}_5 - \text{S}_1$  спинного мозга новорожденных крысят, помещали в раствор Хенкса. Далее осуществляли ферментативную обработку в специальном растворе (см. ниже). Длительность обработки зависела от возраста крыс и составляла от двух до пяти минут при  $37^\circ\text{C}$  [1]. Используемый раствор состоял из следующих компонентов: 1 мл раствора Хенкса, 1 мл среды Игла, 1 мг/мл проназы-Е, 2 мг/мл коллагеназы (тип 1А). В качестве буфера применяли 10 ммоль/л  $\text{HEPES-Na}$  (pH 7.4). По окончании ферментативной обработки ганглии тщательно отмывали путем центрифугирования (1 мин, 900 об/мин) и последующей смены надосадовой жидкости. Отмывку проводили в среде Игла с добавлением глюкозы (0.6%), фетальной сыворотки коровы (10%), гентамицина (40 ед/мл) и глутамина (2 ммоль/л). Далее в этой же среде культивировали изолированные нейроны, полученные после отмывки путем механической диссоциации при помощи пипетирования. Добавление культуральной среды к получаемой клеточной суспензии осуществляли для достижения необходимой плотности нейронов в объеме чашки Петри. При этом шванновские клетки и фибробласты осаждались на дне чашки Петри (90 мм) в течение 25 мин при  $37^\circ\text{C}$ . В результате описанных операций была получена культура клеток, состоявшая главным образом из сенсорных нейронов. Затем нейроны культивировали в чашках Петри (40 мм), дно которых было покрыто коллагеном, полученным из хвостов крыс. Спустя один-два часа после завершения культивирования отбирали для проведения опытов визуально неповрежденные клетки. Записи электрической активности нейрональной мембраны проводили на клетках, которые сохраняли жизнеспособность в течение одних суток культивирования.

Для исследования токов каналов  $\text{Na}_v1.8$  использовали стандартные растворы. Состав внеклеточного раствора (концентрации представлены в ммоль/л):  $\text{NaCl} - 65$ , тетродотоксин  $- 0.0001$ ,  $\text{MgCl}_2 - 2$ ,  $\text{CaCl}_2 - 2$ ,  $\text{HEPES-Na} - 10$ ,  $\text{Choline-Cl} - 70$ , pH 7.4; состав внутриклеточного раствора:  $\text{NaCl} - 10$ ,  $\text{MgCl}_2 - 2$ ,  $\text{CsF} - 100$ ,  $\text{CsCl} - 40$ ,  $\text{HEPES-Na} - 10$ , pH 7.2. Изменения pH осуществляли с помощью  $\text{CsOH}$  и  $\text{HCl}$ . Присутствие ионов фтора во внутриклеточном растворе было необходимо для блокирования кальциевых токов. Также в составе обоих растворов отсутствовали ионы калия, что позволило исключить все компоненты калиевого тока [15, 16]. При этом добавление тетродотоксина во внеклеточный раствор блокировало все тетродотоксинчувствительные натриевые каналы, что делало возможным реги-

стрировать ответы только каналов  $\text{Na}_v1.8$ . Реактивы, использованные в работе, приобретали в фирме Sigma (США).

Исследуемые пептиды были синтезированы фирмой ООО «НПФ Верта» (Россия) методом классического пептидного синтеза, для чего применяли реактивы и производные аминокислот фирм Sigma (США) и Iris Biotech GmbH (Германия). Полученные пептиды характеризовали с помощью аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (чистота > 95%) и масс-спектрометрии.

Для регистрации ионных токов исследуемые нейроны с помощью микропипетки переносили в экспериментальную камеру, объем которой составлял 200 мкл. Полная замена наружного раствора в камере происходила за одну минуту под действием силы тяжести путем пассивного потока.

Эксперименты осуществляли методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp method) в конфигурации «регистрация активности целой клетки» («whole-cell recording») [17]. Для этого использовали аппаратно-программный комплекс, состоящий из усилителя ЕРС 7 (patch-clamp L/M-ЕРС 7), цифро-аналогового и аналого-цифрового преобразователей и персонального компьютера. Пакет программ для автоматизации научных исследований был создан в лаборатории физиологии возбудимых мембран Института физиологии им. И.П. Павлова РАН [18].

Микроэлектроды, использованные в работе, изготавливали из мягкого стекла в две стадии в соответствии с описанием, приведенным в работе [17], применяя пуллер для микропипеток Р-97 (Sutter Instrument, США). Микроэлектрод заполняли внутриклеточным раствором и с помощью микроманипулятора вводили в экспериментальную камеру с внеклеточным раствором. При этом в микроэлектроде создавали небольшое положительное давление для предотвращения попадания в него наружного раствора. Далее микроэлектрод подводили ко дну экспериментальной камеры так, чтобы он прижимался к поверхности клеточной мембраны находящегося там нейрона для создания плотного (высокоомного) контакта, после чего мембранный фрагмент под микроэлектродом разрушали, прикладывая отрицательное давление. При прорыве мембраны под кончиком микроэлектрода возникали высокоамплитудные емкостные составляющие ионного тока, которые сначала частично компенсировались аппаратным способом, а затем полностью — программным. Таким образом происходила реализация конфигурации «whole-cell». После этого микроэлектрод вместе с нейроном поднимали над дном камеры, что позволяло производить смену внеклеточного раствора в ходе эксперимента без ухудшения

условий регистрации натриевых токов. Перед началом записи ионных токов выдерживали паузу в несколько минут для осуществления внутриклеточной перфузии нейрона раствором, заполняющим микроэлектрод. Максимальная длительность эксперимента составляла один час.

При проведении экспериментов постоянно контролировали величину последовательного сопротивления ( $R_S$ ). Она не должна превышать 3 МОм, иначе стационарные и кинетические характеристики измеряемых токов будут получены с большими ошибками [19]. Отметим, что и значение эффективного заряда активационного воротного устройства каналов  $\text{Na}_v1.8$  ( $Z_{\text{eff}}$ ) может оказаться некорректным, если величина  $R_S$  превышает 3 МОм.

Погрешность метода, которая также определяется величиной  $R_S$ , связана с точностью фиксации трансмембранной разности потенциалов. Реальная величина трансмембранной разности потенциалов определяет положение исследуемых стационарных функций каналов  $\text{Na}_v1.8$  относительно оси  $E$ . Стационарная ошибка фиксации потенциала оценивается с помощью формулы:

$$\Delta E \approx I_{\text{Na}}^{\text{max}} R_S,$$

где  $I_{\text{Na}}^{\text{max}}$  — максимальное амплитудное значение натриевых токов.

На величину  $\Delta E$  должны сдвигаться вправо «реальные» значения потенциалозависимостей стационарных функций натриевых каналов. Наименьшая ошибка фиксации (менее 1 мВ) бывает в том случае, когда ток  $I_{\text{Na}}^{\text{max}}$  не превышает 1 нА. Тогда ошибкой метода можно пренебречь.

Помимо величины  $R_S$  в процессе эксперимента контролировали величину емкости мембраны ( $C_m$ ). Токи, текущие через емкость мембраны ( $I_C$ ), и токи утечки ( $I_L$ ) вычитали из суммарного ионного тока с помощью специальной программной процедуры.

В диапазоне потенциалов от  $-60$  мВ до  $45$  мВ последовательно подавали ступеньки напряжения с шагом  $5$  мВ. Длительность каждого из тестирующих импульсов составляла  $50$  мс. В ответ на каждую ступеньку напряжения регистрировали пиковые (амплитудные) значения токов ( $I_{\text{peak}}$ ), что позволяло построить «пиковую» вольтамперную характеристику исследуемых натриевых каналов, а также зависимость величины «хордовой» проводимости от потенциала  $G_{\text{Na}}(E)$ :

$$G_{\text{Na}}(E) = I_{\text{ampl}}(E)/(E - E_{\text{Na}}),$$

где  $I_{\text{ampl}}(E)$  — зависимость амплитудных значений натриевого тока от потенциала,  $E_{\text{Na}}$  — величина потенциала реверсии натриевого тока.

Следующим шагом являлось построение логарифмической потенциальности  $L(E)$  с использованием метода Алмерса [20] для расчета  $Z_{\text{eff}}$  каналов  $\text{Na}_V1.8$ . Этот метод делает возможным оценить перенос заряда активационной воротной системы каналов  $\text{Na}_V1.8$  на основании измерения пиковой вольтамперной характеристики канала [20]. Исходя из того, что число открытых каналов ( $N_o$ ) пропорционально величине хордовой проводимости  $G_{\text{Na}}(E)$ , а число закрытых каналов ( $N_c$ ) соответствует  $\{G_{\text{Na}}^{\text{max}} - G_{\text{Na}}(E)\}$ , где  $G_{\text{Na}}^{\text{max}}$  – максимальная величина хордовой про-

водимости, достигаемая при таких потенциалах, когда все каналы оказываются открытыми (по активационному воротному механизму), можно построить функцию  $L(E)$  [20]:

$$L(E) = \ln(G_{\text{Na}_s}(E)/(G_{\text{Na}_s}^{\text{max}} - G_{\text{Na}_s}(E))).$$

Приведенная здесь функция  $L(E)$  позволяет определить «предельную логарифмическую чувствительность» к потенциалу активационного воротного устройства каналов  $\text{Na}_V1.8$ , поскольку при переходе каналов из открытого в закрытое состояние (при  $E \rightarrow -\infty$ ) должно выполняться распределение Больцмана [20]:

$$\lim_{E \rightarrow -\infty} (N_o/N_c) = \lim_{E \rightarrow -\infty} \{G_{\text{Na}}(E)/[G_{\text{Na}}^{\text{max}} - G_{\text{Na}}(E)]\} \rightarrow C \cdot \exp[(Z_{\text{eff}}eE)/(kT)],$$

где  $C$  – константа,  $k$  – постоянная Больцмана,  $T$  – абсолютная температура,  $Z_{\text{eff}}$  – эффективный заряд, выраженный в единицах заряда электрона.

Согласно теории Алмерса, при величине  $E$ , стремящейся к  $-\infty$ , функция  $C \cdot \exp[Z_{\text{eff}}eE/kT]$  представляет собой одну экспоненту, которую в логарифмическом масштабе можно представить с помощью регрессионной прямой, проходящей через три-пять начальных точек функции  $L(E)$ . Проведенный нами ранее анализ показывает, что именно каналы  $\text{Na}_V1.8$  позволяют применить метод Алмерса для оценки  $Z_{\text{eff}}$  с удовлетворительной точностью, поскольку их инактивационный процесс является достаточно медленным и не вносит дополнительной погрешности в измерения эффективного заряда, переносимого при открывании этих каналов [8].

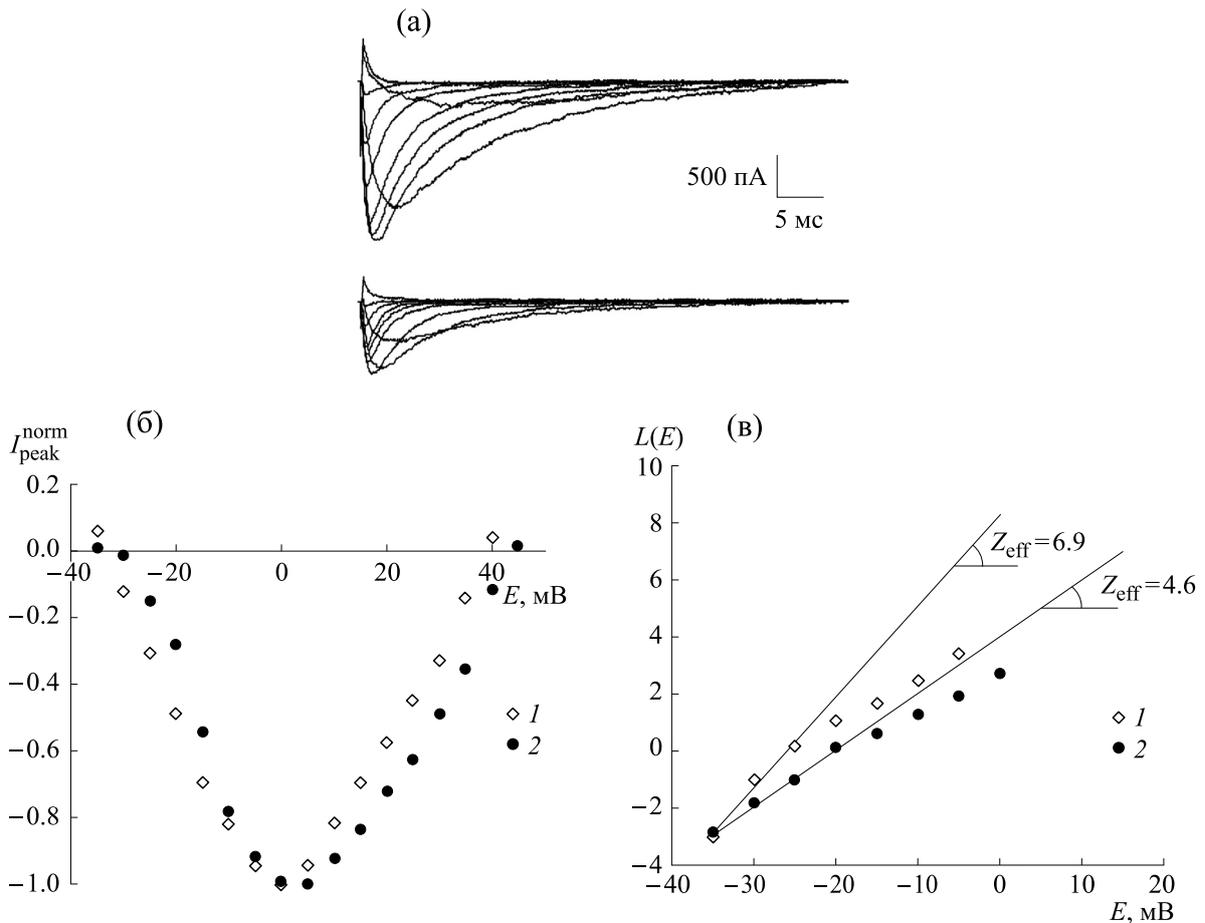
**Метод органотипической культуры ткани.** Эксперименты проводили на эксплантатах дорзальных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов, культивируемых в чашках Петри на подложках из коллагена в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе («Sanyo», Япония) в течение трех суток при  $36.5^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ . Питательная среда содержала 45% раствора Хенкса, 40% среды Игла с добавлением инсулина (0.5 ед/мл), глюкозы (0.6%), глутамина (2 мкмоль/л), гентамицина (100 ед/мл) и 10% фетальной сыворотки коровы. Контрольными служили эксплантаты, культивируемые только в условиях питательной среды. Для количественной оценки роста эксплантатов применяли морфометрический метод [21, 22]. Индекс площади (ИП) рассчитывали как отношение площади зоны роста эксплантата к исходной центральной площади, где находились немигрирующие клетки. Контрольное значение ИП принимали за 100%. Для визуализации объектов использовали микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Герма-

ния). Полученные изображения анализировали с использованием программ ImageJ и ZEN\_2012.

**Конформационный анализ молекул коротких пептидов.** Конформационный анализ молекул тетрапептидов Ac-RERR-NH<sub>2</sub> и Ac-REAR-NH<sub>2</sub>, а также молекулы трипептида Ac-RER-NH<sub>2</sub> проведен методом Монте-Карло с последующей минимизацией энергии [23] в рамках пакета программ ZMM [24–28]. Поскольку моделировалось состояние пептидных молекул при их лиганд-рецепторном связывании с белковой мишенью, значение диэлектрической проницаемости среды  $\epsilon$  было принято постоянным и равным 10. Гуанидиновые группы боковых цепей аргининовых остатков (R) считались положительно заряженными в связи с тем, что указанные группы остаются протонированными даже в толще белка [29]. Карбоксильную группу боковой цепи остатка глутаминовой кислоты (E) рассматривали в двух формах, отрицательно заряженной и электронейтральной, так как трудно предположить однозначно, какой заряд несет указанная функциональная группа в момент образования лиганд-рецепторного комплекса.

Все вычисления проводили с применением силового поля AMBER для расчета ван-дер-ваальсовых взаимодействий [30, 31]. Минимизация энергии молекулярной системы методом Монте-Карло прекращалась, когда 2000 последовательных актов минимизации не приводили к снижению энергии обнаруживаемого в процессе расчетов глобального конформационного минимума. Для дальнейшего анализа были отобраны все устойчивые конформации, обладающие энергией не выше 7 ккал/моль относительно наиболее низкоэнергетической из полученных конформаций.

**Статистический анализ.** Статистический анализ полученных экспериментальных данных про-



**Рис. 1.** Исследование влияния тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> (100 нмоль/л) на функциональную активность каналов Na<sub>v</sub>1.8. (а) – Семейства натриевых токов, полученные в контрольных условиях (сверху) и после приложения тетрапептида (снизу). Поддерживаемый потенциал –110 мВ, длительность 500 мс; тестирующий потенциал изменяли с шагом 10 мВ. (б) – Нормированные пиковые вольтамперные характеристики медленных натриевых каналов, построенные по данным контрольного эксперимента (квадраты) и после приложения тетрапептида (кружки). Поддерживаемый потенциал –110 мВ, длительность 500 мс; тестирующий потенциал изменяли с шагом 5 мВ. (в) – Логарифмическая потенциалоочувствительность  $L(E)$  в контрольных условиях (квадраты) и после приложения тетрапептида (кружки). Показано определение величин  $Z_{\text{eff}}$  по тангенсу углов наклона регрессионных прямых.

водился с помощью программы STATISTICA 10.0 с применением  $t$ -критерия Стьюдента (уровень статистической значимости различий экспериментальных и контрольных данных  $p < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

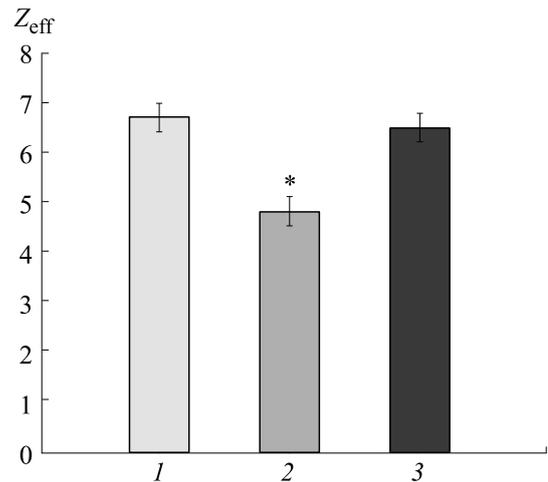
**Результаты, полученные методом локальной фиксации потенциала.** Семейства токов каналов Na<sub>v</sub>1.8 в контрольных условиях и после приложения фрагмента молекулы дефенсина NP-1 (тетрапептид Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, 100 нмоль/л) представлены на рис. 1а. Небольшое снижение амплитуд токов может быть обусловлено так называемым «*run-down*» эффектом, который внутренне присущ методу локальной фиксации потенциала и заключается в постепенном снижении плотности исследуемых каналов из-за ухудшения функцио-

нального состояния клетки в условиях перфузии в течение эксперимента. Регистрация амплитудных (пиковых) значений токов в ответ на каждую ступеньку напряжения позволила построить «пиковую» вольтамперную характеристику  $I_{\text{peak}}(E)$  (рис. 1б). Сравнение вольтамперных характеристик демонстрирует изменение крутизны левой ветви указанной функции после воздействия тетрапептида. Этот эффект, наблюдаемый при наиболее отрицательных значениях мембранных потенциалов, при которых еще генерируются исследуемые токи, позволяет с помощью метода Алмерса количественно охарактеризовать процесс лиганд-рецепторного связывания [20]. Функция  $L(E)$ , описывающая «предельную логарифмическую чувствительность» к потенциалу активационного воротного устройства каналов

$\text{Na}_V1.8$ , представлена на рис. 1в. Тангенс угла наклона регрессионной прямой, построенной по первым точкам функции  $L(E)$ , позволяет определить величину эффективного заряда ( $Z_{\text{eff}}$ ) активационного воротного устройства канала  $\text{Na}_V1.8$ . Приложение тетрапептида Ас-REARR- $\text{NH}_2$  в концентрации 100 нмоль/л снижало величину эффективного заряда с контрольного значения  $Z_{\text{eff}} = 6.9$  до значения 4.6 (рис. 1в).

На рис. 2 представлены обобщенные данные действия на  $Z_{\text{eff}}$  двух исследованных тетрапептидов. Эффективное связывание с каналом проявляет только тетрапептид Ас-REARR- $\text{NH}_2$ . После его воздействия среднее значение  $Z_{\text{eff}}$  достоверно снижалось от  $6.4 \pm 0.3$  ( $n = 17$ ) в контрольных условиях до  $4.6 \pm 0.3$  ( $n = 23$ ). Этот эффект полностью устранялся при замене одного из аргининов на электронейтральный аланин: при воздействии тетрапептида Ас-REAR- $\text{NH}_2$  (100 нмоль/л) величина  $Z_{\text{eff}}$  не отличалась от контрольной и составила  $6.3 \pm 0.3$  ( $n = 22$ ) (рис. 2). Полученные результаты указывают на важнейшую роль двух аминокислотных остатков аргинина, которые должны находиться на определенном расстоянии друг от друга в атакующей молекуле. Можно предположить, что именно в этом случае происходит процесс лиганд-рецепторного связывания атакующей молекулы с молекулой канала  $\text{Na}_V1.8$ . Насколько специфичен этот процесс или, другими словами, существует ли другая мишень на мембране сенсорного нейрона, с которой также может происходить связывание тетрапептида Ас-REARR- $\text{NH}_2$ , было исследовано нами методом органотипического культивирования.

**Результаты, полученные методом органотипической культуры ткани.** Тетрапептид Ас-REARR- $\text{NH}_2$  был исследован в концентрациях 0.1 пмоль/л, 10 пмоль/л, 0.1 нмоль/л, 1 нмоль/л, 10 нмоль/л и 100 нмоль/л (рис. 3а). В концентрациях 0.1 пмоль/л и 10 пмоль/л исследуемый агент практически не влиял на рост нейритов. ИП эксплантатов дорзальных ганглиев не отличался от контрольного значения. В концентрации 0.1 нмоль/л указанный тетрапептид проявлял нейрит-стимулирующее действие: его введение в питательную среду вызывало достоверную стимуляцию роста нейритов в среднем на 34%. При добавлении в культуральную среду Ас-REARR- $\text{NH}_2$  в концентрации 1 нмоль/л наблюдали недостоверную стимуляцию роста нейритов. ИП экспериментальных эксплантатов был выше на 20%. В концентрациях 10 нмоль/л и 100 нмоль/л Ас-REARR- $\text{NH}_2$  также практически не влиял на рост нейритов дорзальных ганглиев. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что тетрапептид Ас-REARR- $\text{NH}_2$  обладает выра-

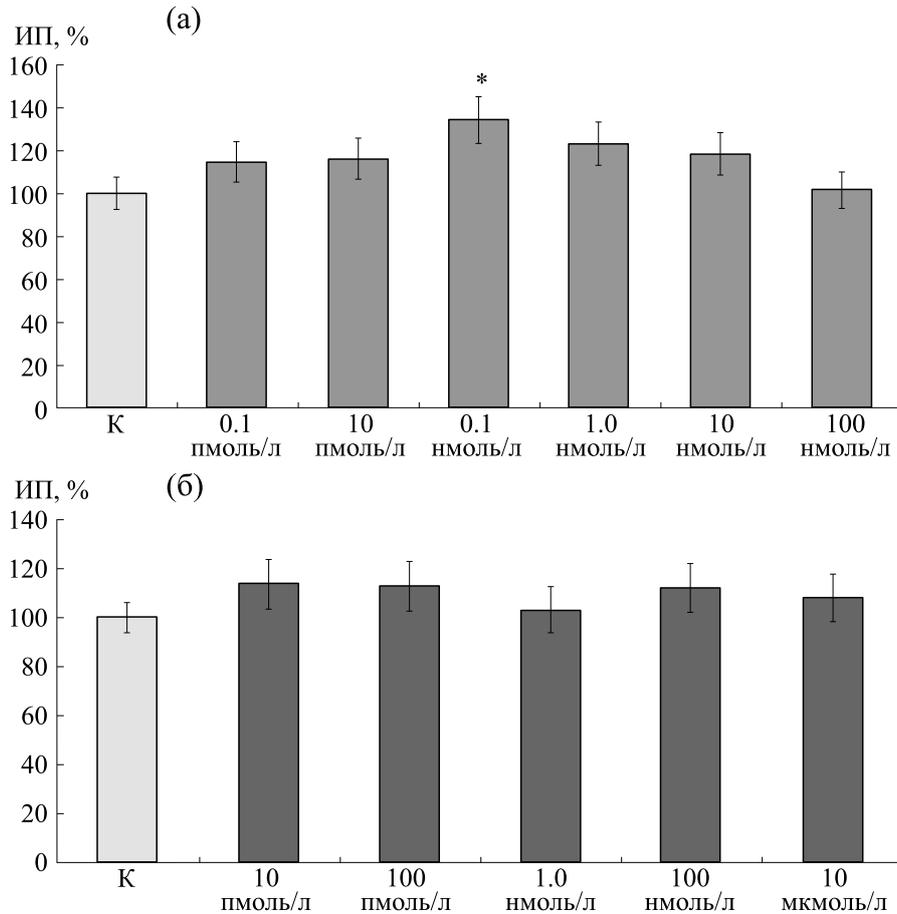


**Рис. 2.** Значения величины эффективного заряда активационной воротной системы каналов  $\text{Na}_V1.8$  после приложения тетрапептидов: 1 – контрольное значение эффективного заряда,  $Z_{\text{eff}} = 6.7 \pm 0.3$  ( $n = 17$ ); 2 – значение эффективного заряда после приложения тетрапептида Ас-REARR- $\text{NH}_2$  (100 нмоль/л),  $Z_{\text{eff}} = 4.6 \pm 0.3$  ( $n = 23$ ); 3 – значение эффективного заряда после приложения тетрапептида Ас-REAR- $\text{NH}_2$  (100 нмоль/л),  $Z_{\text{eff}} = 6.5 \pm 0.3$  ( $n = 22$ ). \* – Различие между контрольными и экспериментальными данными статистически достоверно.

женными нейритстимулирующими свойствами только в случае его применения в очень низкой концентрации (0.1 нмоль/л). Иными словами, данный тетрапептид может запускать сигнальный каскад, ведущий к росту нейритов эмбриональной нервной ткани. Мембранная мишень, активация которой приводит к запуску этого процесса, остается неизвестной. Тот факт, что действие изучаемого тетрапептида не приводит к ингибированию роста, свидетельствует о вероятной безопасности действия исследуемого агента.

Влияние тетрапептида Ас-REARR- $\text{NH}_2$  на рост нейритов сенсорных нейронов было исследовано также в широком диапазоне концентраций от 10 пмоль/л до 10 мкмоль/л (рис. 3б). Введение в питательную среду указанного агента не влияло на рост нейритов дорзальных ганглиев. Этот результат свидетельствует о том, что данный тетрапептид не имеет специфического действия на мембрану сенсорного нейрона.

**Результаты применения конформационного анализа для выяснения механизмов лиганд-рецепторного связывания исследуемых пептидов с медленными натриевыми каналами.** Молекулярный механизм лиганд-рецепторного связывания коротких пептидов с медленными натриевыми каналами  $\text{Na}_V1.8$  может быть объяснен образованием двух ион-ионных связей между положительно заряженными гуанидиновыми группами боковых



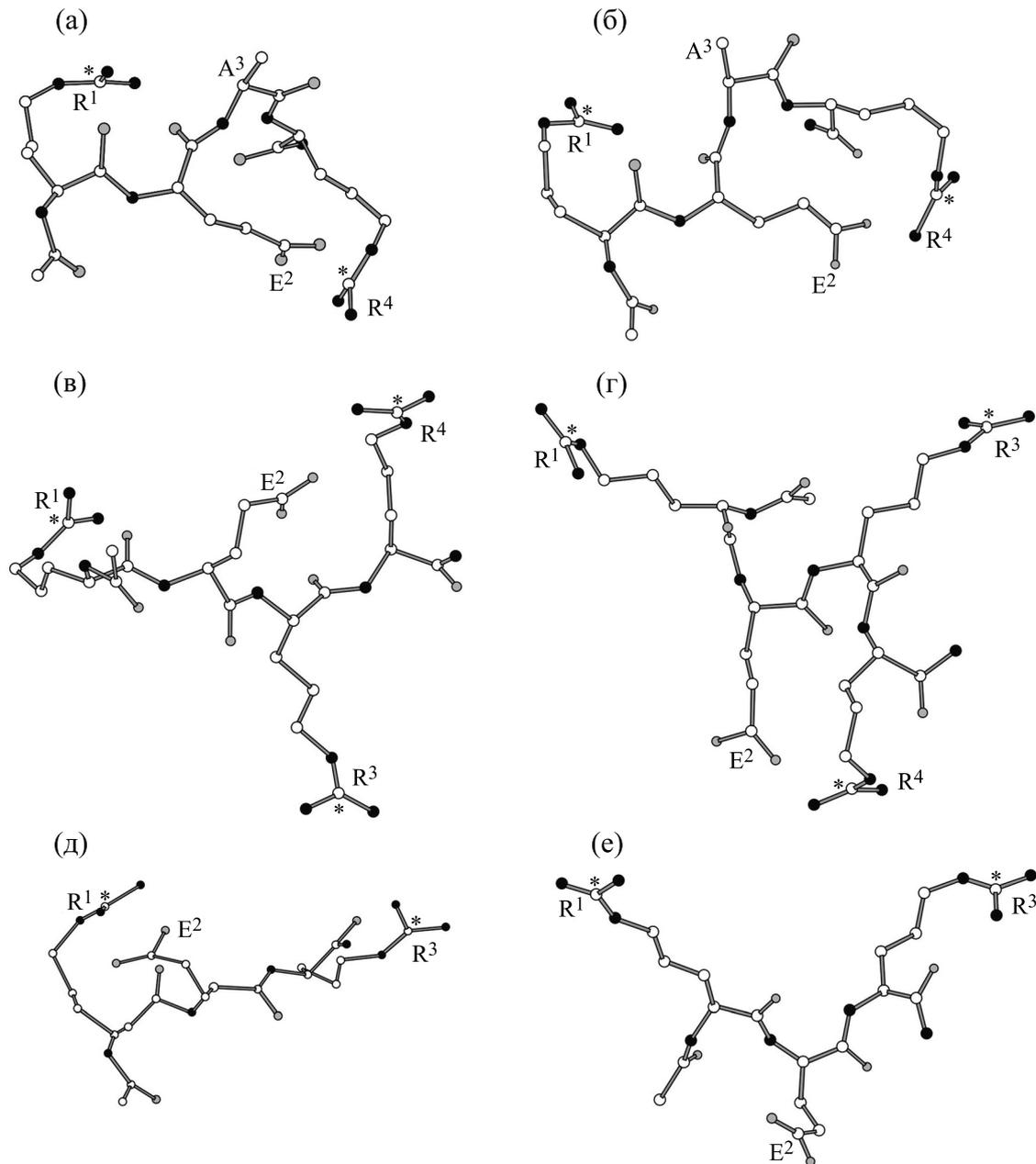
**Рис. 3.** Влияние тетрапептидов в различных концентрациях на рост нейритов дорзальных ганглиев: (а) – значения ИП после приложения тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub>; (б) – значения ИП после приложения тетрапептида Ac-REAR-NH<sub>2</sub>. Светлые столбики – контрольные значения; \* – различие достоверно относительно контрольных эксплантатов,  $p < 0.05$ .

цепей аргинильных остатков и отрицательно заряженными функциональными группами, входящими в состав аминокислотной последовательности канала. Дополнительным указанием на это служит тот факт, что молекула трипептида Ac-RER-NH<sub>2</sub>, в котором присутствуют два аргинильных остатка, достоверно уменьшает величину эффективного заряда активационного воротного устройства каналов Na<sub>v</sub>1.8 [32].

Одной из задач проведения конформационного анализа изучаемых пептидов являлась попытка определения оптимального расстояния между гуанидиновыми группами при их связывании с молекулярной мишенью. В качестве параметра, описывающего расстояние между данными группами, было выбрано расстояние между атомами углерода, входящими в состав гуанидиновых групп, поскольку положение этих атомов примерно соответствует геометрическим центрам указанных функциональных групп, положительный заряд которых делокализован по трем ато-

мам азота. Пространственное строение наиболее низкоэнергетических конформаций молекул Ac-REAR-NH<sub>2</sub>, Ac-RERR-NH<sub>2</sub> и Ac-RER-NH<sub>2</sub> представлено на рис. 4. Для каждой из молекул приведены две формы: в одной из них карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты несла отрицательный заряд, в другой данная группа считалась электронейтральной.

Для молекулы тетрапептида Ac-REAR-NH<sub>2</sub> получено 126 конформаций, когда боковую цепь остатка глутаминовой кислоты рассматривали в отрицательно заряженной форме (рис. 4а), и 297 конформаций, если она была электронейтральной (рис. 4б). Средние значения расстояний R<sup>1</sup>–R<sup>4</sup> между гуанидиновыми группами по обеим полученным выборкам составляют  $9.2 \pm 1.3$  и  $10.7 \pm 1.4$  Å соответственно. Отметим, что в выборках из 50 наиболее низких по энергии конформаций молекулы Ac-REAR-NH<sub>2</sub> вне зависимости от заряда глутаминовой кислоты указанные расстояния не превышают 10 Å в 90% случаев.



**Рис. 4.** Пространственное строение наиболее низкоэнергетических конформаций молекул Ac-REAR-NH<sub>2</sub>, Ac-RERR-NH<sub>2</sub> и Ac-RER-NH<sub>2</sub>: (а) – молекула Ac-REAR-NH<sub>2</sub>, карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты заряжена отрицательно; (б) – молекула Ac-REAR-NH<sub>2</sub>, карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты электронейтральна; (в) – молекула Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты заряжена отрицательно; (г) – молекула Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты электронейтральна; (д) – молекула Ac-RER-NH<sub>2</sub>, карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты заряжена отрицательно; (е) – молекула Ac-RER-NH<sub>2</sub>, карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты электронейтральна. Белые кружки – атомы углерода, серые кружки – атомы кислорода, черные кружки – атомы азота. Приведена нумерация аминокислотных остатков. Атомы углерода гуанидиновых групп боковых цепей аргинильных остатков отмечены звездочками, атомы водорода не показаны.

Когда карбоксильная группа остатка глутаминовой кислоты была заряжена отрицательно, для молекулы Ac-RERR-NH<sub>2</sub> обнаружено 92 конформации (рис. 4в); когда данная группа не несла

заряда – 183 конформации (рис. 4г). Средние значения расстояний между гуанидиновыми группами R<sup>1</sup>–R<sup>3</sup>, R<sup>1</sup>–R<sup>4</sup> и R<sup>3</sup>–R<sup>4</sup> в первом случае равны 12.2 ± 1.9, 11.8 ± 1.7 и 10.9 ± 1.6 Å соответственно,

тогда как во втором —  $12.9 \pm 1.5$ ,  $12.4 \pm 1.3$  и  $12.2 \pm 1.6$  Å соответственно. При этом в выборках из 50 наиболее низкоэнергетических конформаций молекулы Ac-RERR-NH<sub>2</sub> все описанные расстояния оказываются больше 10 Å в 80% конформаций.

Для получения дополнительных данных о возможных величинах расстояний между гуанидиновыми группами в молекулах коротких пептидов, способных к лиганд-рецепторному связыванию с молекулой канала Na<sub>v</sub>1.8, нами был также проведен конформационный анализ молекулы трипептида Ac-RER-NH<sub>2</sub>. Обнаружено 226 конформаций указанной молекулы при заряженной форме боковой цепи глутаминовой кислоты (рис. 4д) и 340 конформаций, если данная группа считалась электронейтральной (рис. 4е). Средние величины расстояний R<sup>1</sup>–R<sup>3</sup> оказались равными  $10.1 \pm 1.6$  и  $12.7 \pm 1.7$  Å соответственно. В 37 из 50 наиболее низких по энергии конформаций молекулы Ac-RER-NH<sub>2</sub> эти расстояния составляют меньше 10 Å, если карбоксильная группа заряжена отрицательно, тогда как в случае ее электронейтральной формы, наоборот, расстояния R<sup>1</sup>–R<sup>3</sup> превышают 10 Å в 44 из 50 наиболее низкоэнергетических конформаций.

Депротонирование карбоксильной группы боковой цепи остатка глутаминовой кислоты приводит к заметному уменьшению общего числа конформаций молекул рассматриваемых коротких пептидов. Это можно объяснить образованием внутримолекулярных ион-ионных связей с участием данной отрицательно заряженной группы и одной из положительно заряженных гуанидиновых групп аргинильных остатков, что ограничивает конформационную свободу молекул пептидов. Если глутаминовая кислота является электронейтральной, подобные связи, очевидно, не образуются.

Замена одного из аргинильных остатков на остаток аланина при переходе от молекулы Ac-RERR-NH<sub>2</sub> к молекуле Ac-REAR-NH<sub>2</sub> вызывает уменьшение расстояния между гуанидиновыми группами во всех рассматриваемых формах данных молекул по двум причинам. Во-первых, молекула Ac-RERR-NH<sub>2</sub> содержит три положительно заряженных гуанидиновых группы, которые электростатически отталкиваются друг от друга. Во-вторых, присутствие остатка аланина вместо объемной боковой цепи аргинильного остатка R<sup>3</sup> позволяет гуанидиновой группе аргинильного остатка R<sup>4</sup> в молекуле Ac-REAR-NH<sub>2</sub> подходить на более близкое расстояние к карбоксильной группе боковой цепи глутаминовой кислоты E<sup>2</sup>, чем это возможно в молекулах тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> и трипептида Ac-RER-NH<sub>2</sub>.

В подавляющем большинстве низкоэнергетических конформаций молекулы Ac-REAR-NH<sub>2</sub> расстояния между гуанидиновыми группами составляют менее 10 Å, тогда как в аналогичных выборках конформаций молекулы Ac-RERR-NH<sub>2</sub> в обеих рассмотренных формах и молекулы Ac-RER-NH<sub>2</sub> в случае, когда карбоксильная группа боковой цепи глутаминовой кислоты считалась электронейтральной, указанные расстояния превышают 10 Å. Можно предположить, что тетрапептид Ac-REAR-NH<sub>2</sub> не оказывает модулирующего действия на натриевые каналы Na<sub>v</sub>1.8 в силу того, что расстояние между гуанидиновыми группами, ответственными за образование ион-ионных связей между атакующей молекулой и аминокислотной последовательностью канала, меньше порогового значения, составляющего 10 Å. Также можно высказать предположение о том, что в момент образования лиганд-рецепторного комплекса между молекулами изучаемых коротких пептидов и молекулой канала Na<sub>v</sub>1.8 карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты является незаряженной, поскольку, несмотря на однозначно проявляемый молекулой трипептида Ac-RER-NH<sub>2</sub> физиологический эффект, расстояния между гуанидиновыми группами в полностью ионизированной форме данной молекулы составляют менее 10 Å в большинстве ее низкоэнергетических конформаций за счет образования внутримолекулярных ион-ионных связей. Дополнительным аргументом в пользу последнего предположения является необходимость разрыва этих внутримолекулярных связей перед образованием межмолекулярных ион-ионных связей при формировании лиганд-рецепторного комплекса с участием тех же гуанидиновых групп, что не требуется, если карбоксильная группа глутаминовой кислоты является электронейтральной. Итак, в результате проведенных расчетов можно сделать вывод о том, что ключевыми структурами при лиганд-рецепторном связывании исследованных нами аргининсодержащих коротких пептидов являются гуанидиновые группы боковых цепей аргинильных остатков, расстояние между которыми должно быть не менее 10 Å.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Основным результатом настоящей работы является обнаружение сильного влияния тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> на потенциалочувствительность медленных натриевых каналов Na<sub>v</sub>1.8. Это позволило предположить, что исследуемый агент в качестве своей специфической мишени имеет определенный сайт, являющийся фрагментом структуры канала Na<sub>v</sub>1.8, связывание с которым

приводит к снижению переноса эффективного заряда активационной воротной системой указанного канала. Относительно низкая концентрация тетрапептида (100 нмоль/л), вызывающая снижение  $Z_{\text{eff}}$ , указывает на высокую специфичность его действия на канал, что подтверждается отсутствием ингибирующего влияния данного агента, исследованного в широкой области концентраций, на рост нейритов эмбриональной нервной ткани. Все это делает тетрапептид Ac-RERR-NH<sub>2</sub> весьма перспективным претендентом на роль анальгетической лекарственной субстанции. Ранее нами был обнаружен аналогичный эффект при изучении трипептида Ac-RER-NH<sub>2</sub> [32].

Известно, что ди- и трипептиды могут транспортироваться в клетку с помощью переносчиков Pept1 и Pept2. Pept1 отличается низкой субстратной специфичностью (способен транспортировать 400 различных дипептидов, 8000 трипептидов, лекарственные препараты, имитирующие структуру ди- и трипептидов, — антибиотики, противовирусные препараты) и низким сродством к субстратам [33, 34]. Транспортёр Pept2 может использовать в качестве субстратов ди-, три- и тетрапептиды (предпочтительно дипептиды) [35, 36]. Ди- и трипептиды могут взаимодействовать непосредственно с ДНК живой клетки благодаря своим малым размерам [37, 38]. В отличие от этого, данные о механизмах прямой доставки тетрапептидов в ядро нервной клетки в литературе отсутствуют.

Увеличение последовательности атакующего пептида до четырех аминокислот посредством добавления еще одного аргинильного остатка вызвало сильное снижение величины  $Z_{\text{eff}}$  до  $4.6 \pm 0.3$  ( $n = 23$ ) при концентрации пептида 100 нмоль/л. Подчеркнем, что данная концентрация на порядок ниже, чем концентрация трипептида Ac-RER-NH<sub>2</sub>, способная вызвать подобный эффект. Это свидетельствует о более высокой аффинности молекулы Ac-RERR-NH<sub>2</sub> по сравнению с молекулой Ac-RER-NH<sub>2</sub> к соответствующему сайту связывания, принадлежащему аминокислотной последовательности канала Na<sub>v</sub>1.8.

Полученные результаты указывают на то, что, во-первых, эффективность узнавания атакующей молекулы может определяться ее общим положительным зарядом, поскольку при переходе от молекулы Ac-RER-NH<sub>2</sub> к молекуле Ac-RERR-NH<sub>2</sub> наблюдается снижение действующей концентрации агента. Во-вторых, добавление положительного заряженного аргинильного остатка приводит к

уменьшению общего количества конформаций пептидной молекулы за счет электростатического отталкивания между тремя присутствующими в молекуле Ac-RERR-NH<sub>2</sub> гуанидиновыми группами, что ограничивает конформационную свободу указанной молекулы по сравнению с молекулами Ac-RER-NH<sub>2</sub> и Ac-REAR-NH<sub>2</sub>. Видимо, это «помогает» атакующей пептидной молекуле принять продуктивную конформацию для формирования лиганд-рецепторного комплекса.

Основываясь на результатах проведенного конформационного анализа, можно предположить, что в образовании лиганд-рецепторного комплекса между молекулой тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> и молекулой канала Na<sub>v</sub>1.8 задействованы аргинильные остатки R<sup>1</sup> и R<sup>3</sup>, расстояние между гуанидиновыми группами которых в большинстве полученных конформаций указанного тетрапептида превышает пороговое значение, равное 10 Å. Молекула тетрапептида Ac-REAR-NH<sub>2</sub> оказывается неспособной к лиганд-рецепторному связыванию как минимум в силу того, что в большинстве низких по энергии конформаций данной молекулы расстояния между гуанидиновыми группами меньше этого порогового значения. Основной вклад в энергию образования лиганд-рецепторного комплекса, по всей видимости, вносят высокоэнергетические ионные связи между положительно заряженными гуанидиновыми группами боковых цепей аргинильных остатков молекулы Ac-RERR-NH<sub>2</sub> и отрицательно заряженными нуклеофильными группами в составе молекулы канала Na<sub>v</sub>1.8. Последний вывод может быть подкреплён тем фактом, что при замене всех аргинильных остатков в молекуле гексапептида Ac-PRERRA-NH<sub>2</sub> на остатки лизина сохранилась способность атакующей молекулы снижать величину  $Z_{\text{eff}}$  активационного воротного устройства медленного натриевого канала Na<sub>v</sub>1.8 [13].

Итак, применение метода локальной фиксации потенциала и конформационного анализа для выяснения механизмов лиганд-рецепторного связывания изучаемых молекул с каналами Na<sub>v</sub>1.8 позволило продемонстрировать, что удлинение аминокислотной последовательности аргининсодержащих коротких пептидов не должно с необходимостью приводить к увеличению расстояния между потенциально участвующими в лиганд-рецепторном связывании гуанидиновыми группами аргинильных остатков. Как показано в настоящей работе, при переходе от молекулы Ac-RER-NH<sub>2</sub> к молекуле Ac-REAR-NH<sub>2</sub> это рас-

стояние, наоборот, уменьшается, что объясняет неспособность связывания последнего агента с исследуемым каналом. Функционально активными оказываются пептиды, в молекулах которых указанное расстояние превышает 10 Å. Предположительно, оптимальным в соответствии с этим критерием является расстояние между гуанидиновыми группами аргинильных остатков R<sup>1</sup> и R<sup>3</sup> в молекуле Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, что делает данный тетрапептид перспективным претендентом на роль лекарственной субстанции нового анальгетика.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование выполнено в рамках реализации Программы НЦМУ и при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-921 от 13.11.2020 г.).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. G. Kostyuk, N. S. Veselovsky, and A. Y. Tsyndrenko, *Neuroscience* **6**, 2423 (1981).
2. Н. С. Веселовский, П. Г. Костюк и А. Я. Цындренко, Докл. АН СССР **249** (60), 1466 (1979).
3. M. S. Gold, D. B. Reichling, M. J. Shuster, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1108 (1996).
4. С. В. Ревенко и И. Ю. Гаврилов, Биол. мембраны **24** (1), 70 (2007).
5. L. V. Borovikova, D. V. Borovikov, V. V. Ermishkin, et al., *Prim. Sensory Neuron* **2**, 65 (1997).
6. A. N. Akopian, L. Sivilotti, and J. N. Wood, *Nature* **379**, 257 (1996).
7. J. Lai, F. Porreca, J. C. Hunter, and M. S. Gold, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**, 371 (2004).
8. В. В. Крылов, И. В. Рогачевский, Т. Н. Шелых, et al., *Frontiers in pain science. Volume 1. New non-opioid analgesics: understanding molecular mechanisms on the basis of patch-clamp and quantum-chemical studies* (Ben-tham Science Publishers Ltd, Sharjah UAE, 2017).
9. R. I. Lehrer and T. Ganz, *Blood* **76**, 2169 (1990).
10. В. Н. Кокряков, *Биология антибиотиков животного происхождения* (Наука, СПб., 1999).
11. В. Б. Плахова, И. В. Рогачевский, Б. Ф. Щеголев и др., *Сенсорные системы* **19** (2), 110 (2005).
12. В. Б. Плахова, Б. Ф. Щеголев, И. В. Рогачевский и др., *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова* **86** (11), 1471 (2000).
13. В. Б. Плахова, И. В. Рогачевский, Т. Н. Шелых и др., *Мед. академ. журн.* **13** (3), 78 (2013).
14. В. Б. Плахова, И. В. Рогачевский, Т. Н. Шелых и др., *Сенсорные системы* **30** (3), 234 (2016).
15. A. A. Elliott and J. R. Elliott, *J. Physiol. (Lond.)* **463**, 39 (1993).
16. P. G. Kostyuk, O. A. Krishtal, and V. I. Pidoplichko, *Nature* **257**, 691 (1975).
17. O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, et al., *Pflügers Arch.* **391**, 85 (1981).
18. Б. В. Крылов, Ю. Ю. Вилин, С. А. Подзорова и др., *Сенсорные системы* **10** (4), 52 (1996).
19. Y. V. Osipchuk and E. N. Timin in *Intracellular Perfusion of Excitable Cells*, Ed. by P. G. Kostyuk and O. A. Krishtal (J. Wiley & Sons, Inc., 1984), pp. 103–129.
20. В. Алмерс, *Мембраны: ионные каналы*, под ред. Ю. А. Чизмаджева (Мир, М., 1981), с. 129–236.
21. V. B. Plakhova, V. A. Penniyaynen, I. L. Yachnev, et al., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **97**, 400 (2019).
22. V. A. Penniyaynen, V. B. Plakhova, I. V. Rogachevsky, et al., *Pathophysiology* **26**, 245 (2019).
23. Z. Li and H. A. Scheraga, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **179**, 333 (1988).
24. B. S. Zhorov, *J. Struct. Chem.* **22**, 4 (1981).
25. B. S. Zhorov, *J. Struct. Chem.* **23**, 649 (1982).
26. B. S. Zhorov and V. S. Ananthanarayanan, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **14**, 173 (1996).
27. B. S. Zhorov and S. X. Lin, *Proteins* **38**, 414 (2000).
28. <http://www.zmmsoft.com>
29. C. A. Fitch, G. Platzer, M. Okon, et al., *Prot. Sci.* **24**, 752 (2015).
30. S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. A. Case, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 765 (1984).
31. S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen, and D. A. Case, *J. Comput. Chem.* **7**, 230 (1986).
32. Т. Н. Шелых, И. В. Рогачевский, А. Д. Ноздрачев и др., Докл. РАН **466** (6), 734 (2016).
33. B. Spanier and F. Rohm, *Compr. Physiol.* **8**, 843 (2018).
34. F. H. Mourad and N. E. Saadé, *Prog. Neurobiol.* **95**, 149 (2011).
35. X. Chen, R. F. Keep, Y. Liang, et al., *Biochem. Pharmacol.* **131**, 89 (2017).
36. Y. J. Fei, J. C. Liu, T. Fujita, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 39 (1998).
37. V. Khavinson, N. Linkova, E. Kukanova, et al., *J. Neurol. Neurosci.* **8**, 1 (2016).
38. N. Kolchina, V. Khavinson, N. Linkova, et al., *Nucl. Acids Res.* **47**, 10553 (2019).

## **A Possible Mechanism of Modulation of Slow Sodium Channels in the Sensory Neuron Membrane by Short Peptides**

**I.V. Rogachevsky, A.D. Kalinina, V.A. Penniyaynen, S.G. Terekhin, S.A. Podzorova,  
B.V. Krylov, and V.B. Plakhova**

*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia*

Possible mechanisms of ligand-receptor binding of arginine-containing tetrapeptides to the  $Na_v1.8$  channels in the primary sensory neuron were investigated. The tetrapeptide Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, acting outside the neuronal membrane, was found to decrease voltage sensitivity of the channels examined. By contrast, the tetrapeptide Ac-REAR-NH<sub>2</sub> did not exhibit the same effect. Conformational analysis used to elucidate the mechanisms of ligand-receptor binding of a number of short peptides investigated herein suggested that positively charged guanidinium groups at the side chains of two arginine residues play a key role in peptide binding. Another amino acid residue (glutamic acid) should be present between these two arginine residues. Our calculations showed that the mechanism of ligand-receptor binding cannot come into effect, if the value of the distance between the guanidinium groups in short peptides molecules is less than a defined threshold value. From the results obtained it can be concluded that the tetrapeptide Ac-RERR-NH<sub>2</sub> and several other peptides capable to bind to the  $Na_v1.8$  channel by the same molecular mechanism have the potential to be the medicinal substances of novel analgesics with peripheral targets.

*Keywords: short peptides,  $Na_v1.8$  channels, nociceptive neuron, conformational analysis*