

612.15 612.146.2

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ФРАГМЕНТЫ ТОКСИНА WTX СНИЖАЮТ АРТЕРИАЛЬНОЕ ДАВЛЕНИЕ У КРЫС В СОСТОЯНИИ ОБЩЕЙ АНЕСТЕЗИИ

© 2023 г. М. С. Северюхина^{1,2}, А. М. Исмаилова¹, Э. Р. Шайхутдинова¹, И. А. Дьяченко¹, Н. С. Егорова³, А. Н. Мурашев¹, член-корреспондент РАН В. И. Цетлин³, Ю. Н. Уткин^{3,*}

Поступило 10.07.2023 г.
После доработки 29.07.2023 г.
Принято к публикации 29.07.2023 г.

Ранее нами было показано, что необычный токсин WTX из яда кобры *Naja kaouthia* при внутривенном введении вызывал снижение артериального давления (АД) и повышение частоты сердечных сокращений (ЧСС) у крыс (Ogay et al., 2005). Для идентификации участка молекулы токсина, отвечающего за эти эффекты, нами исследовано влияние синтетических пептидных фрагментов WTX на АД и ЧСС нормотензивных самцов крыс линии Sprague Dawley, находящихся в состоянии общей анестезии, вызванной препаратами Телазол и Ксилазин. Установлено, что пептиды, соответствующие центральной полипептидной петле WTX и стабилизированные дисульфидной связью, при внутривенном введении в концентрациях от 0.1 до 1.0 мг/мл вызывали продолжительное дозозависимое снижение АД. При этом ЧСС повышалась лишь в первые 5–10 мин после введения. Таким образом, фрагменты WTX, соответствующие центральной полипептидной петле, воспроизводят снижение АД, вызываемое токсином.

Ключевые слова: необычный токсин, WTX, артериальное давление, частота сердечных сокращений

DOI: 10.31857/S2686738923600516, **EDN:** GTLMJI

ВВЕДЕНИЕ

Токсин WTX из яда кобры *Naja kaouthia* относится к семейству трехпетельных токсинов [1, 2], состоит из 65 аминокислотных остатков и содержит пять дисульфидных связей (рис. 1) [3]. Один из дисульфидов расположен в N-концевой петле, что характерно для нетипичных (non-convention-al) токсинов змей [4]. WTX проявляет свойства как α -нейротоксинов змей, так и мускариновых токсинов: он блокирует никотиновые холинорецепторы (нХР) мышечного ($\alpha\beta\gamma\delta$) и $\alpha 7$ -типа, а

также аллостерически взаимодействует с мускариновыми холинорецепторами [5]. Ранее было показано, что артериальное давление (АД) и частота сердечных сокращений (ЧСС) напрямую зависят от функции нХР, а активация или блокада различными агонистами или антагонистами приводит к изменениям гемодинамических параметров [6].

Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что наибольший вклад во взаимодействие с нХР вносит центральная петля II WTX (рис. 1) [7, 8]. Эта петля взаимодействует с ацетилхолин-связывающим карманом нХР, при этом петля I, предположительно, взаимодействует с мембраной, окружающей рецептор [8]. Важная роль петли II во взаимодействии с нХР была установлена ранее для α -нейротоксинов змей [9, 10]. Показано также, что петля II WTX играет существенную роль во взаимодействии с мускариновым холинорецептором [11], и это согласуется с данными для мускариновых токсинов [12].

Ранее было установлено, что внутривенное введение WTX вызывает дозозависимое снижение артериального давления (АД) и повышение частоты сердечных сокращений (ЧСС), и в этом

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

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

*e-mail: utkin@ibch.ru, utkin@yandex.ru

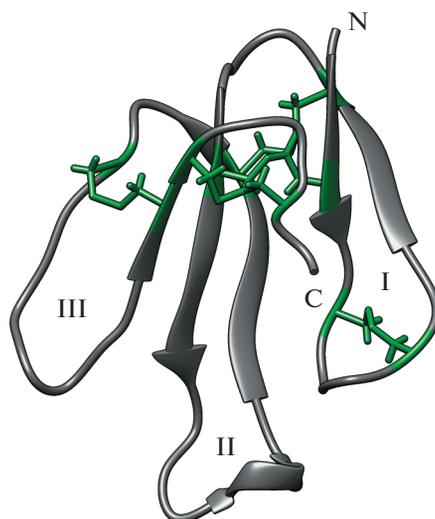


Рис. 1. Пространственная структура токсина WTX (аналог P33A), установленная методом ЯМР (код PDB – 2MJ0). N и C обозначают N- и C-концевые остатки соответственно. Римские цифры обозначают номера полипептидных петель. Дисульфидные связи показаны в виде стержней (выделены зеленым цветом).

процессе участвуют холинергические рецепторы [13]. Учитывая тот факт, что полипептидная петля II WTX участвует во взаимодействии токсина с холинорецепторами, мы решили проверить, будут ли пептидные фрагменты аминокислотной последовательности WTX, соответствующие этой петле, оказывать влияние на АД и ЧСС. Следует отметить, что ранее синтетический фрагмент, включающий петлю II, циклизованную дисульфидными связями, был получен для нейротоксина кобры *N. naja philippinensis* [14]. Пептидный фрагмент сохранил способность взаимодействовать с нХР, присущую исходному токсину, хотя и гораздо менее эффективно. Методом пептидного синтеза были синтезированы два пептидных фрагмента токсина WTX (WTXf1 и WTXf2), N- и C-концевые участки которых соединены дисульфидной связью, и исследовано влияние этих пептидов на АД и ЧСС крыс, находящихся в условиях общей анестезии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пептиды WTXf1 (17 а.о.) и WTXf2 (21 а.о.) получили методом твердофазного синтеза по методике, использованной ранее для синтеза фрагмента центральной петли трех-петельного белка человека; пространственная структура фрагмента была фиксирована введением дисульфида [15]. Чистоту пептидов подтверждали с помощью аналитической ВЭЖХ, а молекулярные массы определяли с помощью масс-спектрометрии. Молекулярная масса WTXf1 составила 2240.2 Да, а WTXf2 – 2618.4 Да, что в пределах ошибки измерений соответствует расчетным величинам.

В опытах использовали самцов крыс аутбредной линии Sprague-Dawley статуса SPF с массой тела 250–300 г (НПП Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН). Все процедуры были одобрены комиссией ФИБХ РАН по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных (протокол-заявка № 910/22). Для исследования отобрали животных с исходным значением АД в пределах 100–140 мм. рт.ст., соответствующим норме [16]. Животным под наркозом препаратами телазол (4 мг/кг) и ксилазин (12 мг/кг, внутримышечно) [17] через надрез на вентральной стороне шеи имплантировали катетеры в общую сонную артерию и яремную вену. Исследуемые вещества и растворитель (физиологический раствор) вводили через внутривенный катетер в объеме 1 мл/кг. Для регистрации АД и ЧСС прямым способом артериальный катетер подключали к установке Powerlab ML125 (AD Instrument, Australia).

Животных распределяли на 7 групп: 1 группа – контроль с введением физиологического раствора ($n = 6$); 2–4 группы – введение WTXf1 в концентрациях 0.1 мг/кг ($n = 6$), 0.3 мг/кг ($n = 3$) и 1 мг/кг ($n = 1$); 5–7 группы – WTXf2 в концентрациях 0.1 мг/кг ($n = 3$), 0.3 мг/кг ($n = 6$) и 1 мг/кг ($n = 3$) соответственно. Эксперимент ставился в условиях общей анестезии (телазол + ксилазин). После 15-минутной регистрации исходных значений (baseline) АД и ЧСС через венозный катетер животным вводили препарат согласно групповой принадлежности и продолжали регистрировать параметры в течение 90 мин после введения веществ.

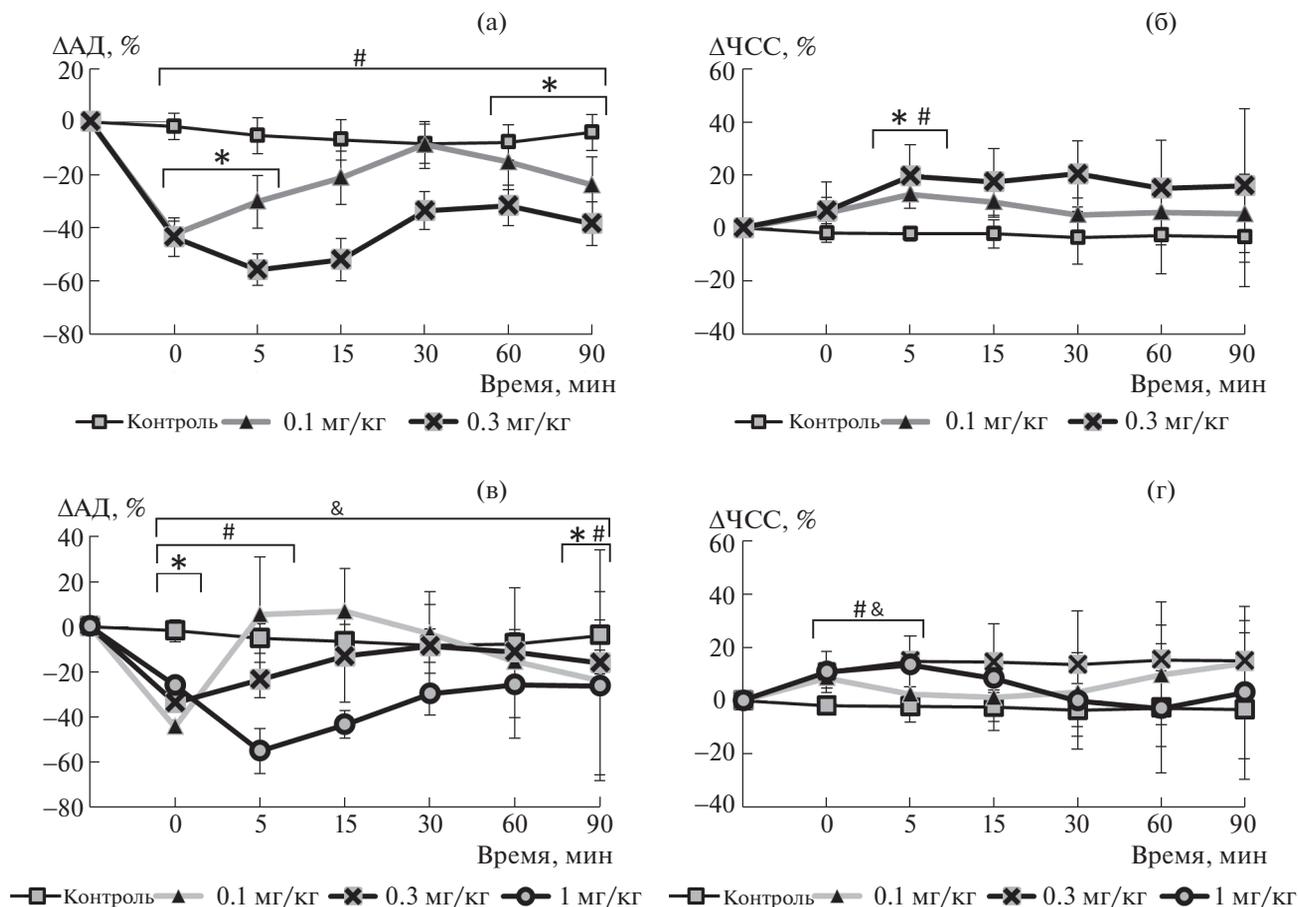


Рис. 2. Изменения АД (а, в) и ЧСС (б, г) при внутривенном введении крысам пептидов WTXf1 (а, б) и WTXf2 (в, г). * $p \leq 0.05$ по U-критерию Манна–Уитни для групп WTXf1 (0.1 мг/кг) и WTXf2 (0.1 мг/кг) в сравнении с контрольной группой; # $p \leq 0.05$ по U-критерию Манна–Уитни для групп WTXf1 (0.3 мг/кг) и WTXf2 (0.3 мг/кг) в сравнении с контрольной группой. & $p \leq 0.05$ по U-критерию Манна–Уитни группы WTXf2 (1 мг/кг) в сравнении с контрольной группой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В проводившихся ранее экспериментах крысам вводили WTX в дозах 0.5, 1 и 2 мг/кг [13]. Мы начали исследование активности синтетических пептидов с дозы 1 мг/кг. При введении животному пептида WTXf1 в такой дозе произошло катастрофическое падение давления до 40 мм. рт. ст., сопровождавшееся гибелью животного. Вследствие этого более детального исследования WTXf1 в дозе 1 мг/кг не проводили.

При введении WTXf1 в дозе 0.3 мг/кг в первые пять минут наблюдалось резкое падение АД более чем на 50%; затем оно постепенно увеличивалось, но оставалось сниженным на 30% от исходных значений. Примерно через 30 мин после введения начался повторный спад АД, к концу регистрации значения также были на 45% ниже исходной величины (рис. 2а). Необходимо отметить, что два животных из этой группы погибли сразу после эксперимента, поэтому дальнейшее исследование WTXf1 в этой дозе было остановлено.

При введении WTXf1 в дозе 0.1 мг/кг наблюдалось резкое падение АД на 40% ниже исходного значения, однако к 25-й минуте оно практически вернулось к начальному уровню. После 25-й минуты регистрации АД достоверно снизилось и стабильно оставалось сниженным на 25% ниже исходного уровня до конца регистрации (рис. 2а).

На протяжении всего времени регистрации показателей, достоверных изменений АД у животных в контрольной группе не наблюдалось.

Введение WTXf2 в дозе 1 мг/кг привело к достоверному падению АД на 45% от исходных значений на 5-й минуте. До 40-й минуты давление имело тенденцию к восстановлению, но оставалось достоверно сниженным на 27% от исходного уровня до конца регистрации (рис. 2в). Введение WTXf2 в дозе 0.3 мг/кг вызвало падение АД на 31% в первую минуту регистрации с последующим восстановлением до 87% от исходных значений на 20-й минуте. Далее АД оставалось достоверно сниженным до конца записи (80–83% от

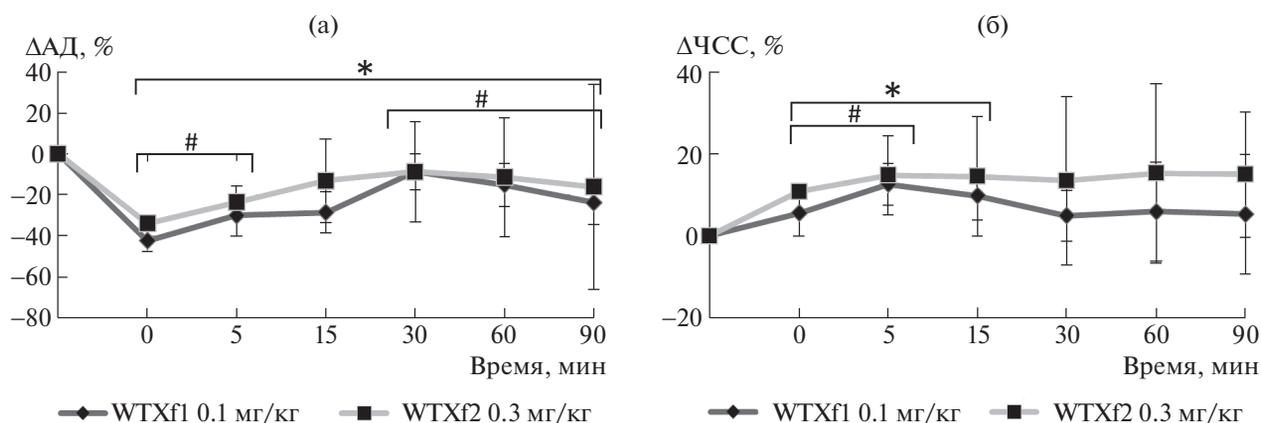


Рис. 3. Сравнение влияния WTxf1 и WTxf2 в дозах 0.1 и 0.3 мг/кг, соответственно, на АД (а) и ЧСС (б). * $p \leq 0.05$ для WTxf1 в дозе 0.1 мг/кг по сравнению с исходными значениями (Т-тест для зависимых выборок), # $p \leq 0.05$ для WTxf2 в дозе 0.3 мг/кг по сравнению с исходными значениями (Т-тест для зависимых выборок).

исходных значений к 90-й минуте) (рис. 2в). Введение WTxf2 в дозе 0.1 мг/кг привело к падению АД на 45% в первую минуту с восстановлением до исходных значений в течение 3–4 мин. Далее наблюдалось кратковременное повышение АД на 5%, которое не являлось статистически достоверным и продолжалось до 15-й минуты после введения препарата. Затем АД постепенно снижалось на 26% по сравнению с исходными значениями в конце регистрации (рис. 2в).

В контрольной группе после введения физиологического раствора не наблюдалось статистически значимых изменений ЧСС в течение всего периода регистрации.

В группах с введением WTxf1 в дозе 0.1 мг/кг наблюдалось статистически значимое повышение ЧСС относительно контрольной группы на 5–10-й минутах записи и на 5-й минуте в дозе 0.3 мг/кг (рис. 2б). В группах, которым вводили WTxf1 в дозах 0.3 и 1 мг/кг, ЧСС статистически значимо повышалась до 5-й минуты регистрации (рис. 2г), тогда как в группе с введением WTxf2 в дозе 0.1 мг/кг статистически значимых различий относительно контрольной группы не наблюдалось.

Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее перспективными для дальнейшего более детального исследования являются дозы 0.1 и 0.3 мг/кг для WTxf1 и WTxf2 соответственно. Нами проведено сравнение влияния этих доз на АД и ЧСС (рис. 3). В общем наблюдаемые эффекты достаточно похожи. Однако имеются и некоторые различия. Так, для WTxf1 в дозе 0.1 мг/кг наблюдалось статистически значимое снижение АД на протяжении всего эксперимента, в то время как WTxf2 в дозе 0.3 мг/кг вызывал статистически значимое снижение АД с 1-й по 10-ю минуту и с 30-й минуты до конца регистрации (рис. 3а). Статистически значимое повышение ЧСС отно-

сительно исходных значений для WTxf1 в дозе 0.1 мг/кг наблюдалось с 1-й до 20-й минуты после введения, для WTxf2 в дозе 0.3 мг/кг лишь с 1-й по 5-ю минуту (рис. 3б). Таким образом, влияние WTxf1 более выражено и требует меньших доз для достижения сходных изменений АД по сравнению с WTxf2. Однако WTxf1 в дозах 0.3 и 1 мг/кг в условиях наркоза оказывает стойкое снижение АД и проявляет токсические свойства. Критическое снижение АД может указывать на дозозависимое угнетающее действие WTxf1 на вазоконстрикторный эффект симпатической нервной системы [18]. Интересно отметить, что эффективная доза WTxf1 (0.1 мг/кг = 0.045 мкмоль/кг) существенно ниже, чем у известных низкомолекулярных препаратов: 6.0–15.0 мкмоль/кг для фентоламина [19, 20] и 20.0–80.0 мкмоль/кг для каптоприла [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в ходе исследования различных доз двух исследуемых фрагментов токсина WTХ на крысах линии Sprague-Dawley, в состоянии наркоза, выявили дозозависимое гипотензивное действие с первой минуты введения, что указывает на способность каждого из фрагментов оказывать прямое миотропное действие на сосуды. Также установлено, что введение фрагментов WTХ статистически значимо повышает показатели ЧСС в первые 5–10 мин после введения с последующим быстрым возвращением к первоначальным значениям. Таким образом, фрагменты WTХ, соответствующие аминокислотной последовательности центральной петли токсина, проявляют гипотензивное действие, наблюдавшееся ранее для целого токсина [13]. Поскольку исследованные пептиды составляют менее 1/3 аминокислотной последовательности

WTX, они являются более перспективными в качестве основы для создания лекарственных препаратов, чем сам токсин. Особенно это касается более короткого пептида WTXf1, обладающего к тому же большей активностью.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научно-го проекта № 21-14-00316.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных одобрены комиссией ФИБХ РАН по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных (протокол-заявка № 766/20).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kessler P., Marchot P., Silva M., et al.* The three-finger toxin fold: a multifunctional structural scaffold able to modulate cholinergic functions. // *J. Neurochem.* 2017. V. 142. Suppl. 2. P. 7–18.
2. *Nirthanan S.* Snake three-finger α -neurotoxins and nicotinic acetylcholine receptors: molecules, mechanisms and medicine. // *Biochem. Pharmacol.* 2020. V. 181. P. 114168.
3. *Utkin Y.N., Kukhtina V.V., Kryukova E.V., et al.* “Weak toxin” from *Naja kaouthia* is a nontoxic antagonist of alpha 7 and muscle-type nicotinic acetylcholine receptors. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 19. P. 15810–15815.
4. *Nirthanan S., Gopalakrishnakone P., Gwee M.C., et al.* Non-conventional toxins from Elapid venoms. *Toxicon.* 2003. V. 41. № 4. P. 397–407.
5. *Mordvintsev D.Y., Polyak Y.L., Rodionov D.I., et al.* Weak toxin WTX from *Naja kaouthia* cobra venom interacts with both nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *FEBS J.* 2009. V. 276. № 18. P. 5065–5075.
6. *Janssen B.J., Leenders P.J., Smits J.F.* Short-term and long-term blood pressure and heart rate variability in the mouse. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000. V. 278. № 1. P. R215–R225.
7. *Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Shenkarev Z.O., et al.* Central loop of non-conventional toxin WTX from *Naja kaouthia* is important for interaction with nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon.* 2016. V. 119. P. 274–279.
8. *Shenkarev Z.O., Chesnokov Y.M., Zaigraev M.M., et al.* Membrane-mediated interaction of non-conventional snake three-finger toxins with nicotinic acetylcholine receptors. *Commun. Biol.* 2022. V. 5. №1. P. 1344.
9. *Fruchart-Gaillard C., Gilquin B., Antil-Delbeke S., et al.* Experimentally based model of a complex between a snake toxin and the alpha 7 nicotinic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2002. V. 99. № 5. P. 3216–3221.
10. *Nys M., Zarkadas E., Brams M., et al.* The molecular mechanism of snake short-chain α -neurotoxin binding to muscle-type nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 4543.
11. *Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Shulepko M.A., et al.* Structural Insight into Specificity of Interactions between Nonconventional Three-finger Weak Toxin from *Naja kaouthia* (WTX) and Muscarinic Acetylcholine Receptors. *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 39. P. 23616–23630.
12. *Marquer C., Fruchart-Gaillard C., Letellier G., et al.* Structural model of ligand-G protein-coupled receptor (GPCR) complex based on experimental double mutant cycle data: MT7 snake toxin bound to dimeric hM1 muscarinic receptor. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 36. P. 31661–31675.
13. *Ogay A.Y., Rzhnevsky D.I., Murashev A.N., et al.* Weak neurotoxin from *Naja kaouthia* cobra venom affects haemodynamic regulation by acting on acetylcholine receptors. // *Toxicon.* 2005. V. 45. № 1. P. 939–939.
14. *Juillerat M.A., Schwendimann B., Hauert J., et al.* Specific binding to isolated acetylcholine receptor of a synthetic peptide duplicating the sequence of the presumed active center of a lethal toxin from snake venom. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. № 6. P. 2901–2907.
15. *Mineev K.S., Kryukova E.V., Kasheverov I.E., et al.* Spatial Structure and Activity of Synthetic Fragments of Lynx1 and of Nicotinic Receptor Loop C Models. // *Biomolecules.* 2020. V. 11. № 1. P. 1.
16. *Шаманаев А.Ю., Алиев О.И., Анищенко А.М., и др.* Показатели сердечной деятельности у крыс линии SHR до и после установления стабильно высокого артериального давления // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2016. № 4–6. С. 1115–1118.
17. *Кадомцев Д.В., Пасечникова Е.А., Голубев В.Г.* Золетил-ксилазиновый наркоз в экспериментах у крыс // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2015. № 5–1. С. 56–57.
18. *Haass M., Kübler W.* Nicotine and sympathetic neurotransmission. // *Cardiovasc. Drugs Ther.* 1997. V. 10. № 6. P. 657–665.
19. *Muntzel M.S., Abe A., Petersen J.S.* Effects of adrenergic, cholinergic and ganglionic blockade on acute depressor responses to metformin in spontaneously hypertensive rats. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997. V. 281. № 2. P. 618–623.
20. *Holte H.R., Bjørnstad-Ostensen A., Berg T.* The role of endogenous bradykinin in blood pressure homeostasis in spontaneously hypertensive rats. // *Br. J. Pharmacol.* 1996. V. 118. № 8. P. 1925–1930.
21. *Sharma J.N., Amrah S.S., Noor A.R.* Suppression of hypotensive responses of captopril and enalapril by the kallikrein inhibitor aprotinin in spontaneously hypertensive rats. // *Pharmacology.* 1995. V. 50. № 6. P. 363–369.

SYNTHETIC PEPTIDE FRAGMENTS OF THE TOXIN WTX REDUCE BLOOD PRESSURE IN RATS UNDER GENERAL ANESTHESIA

M. S. Severyukhina^{a,b}, A. M. Ismailova^a, E. R. Shaykhutdinova^a, I. A. Dyachenko^a, N. S. Egorova^c,
A. N. Murashev^a, Corresponding Member of the RAS V. I. Tsetlin^c, and Yu. N. Utkin^{c,#}

^aBranch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russian Federation

^bPushchino State Natural-Science Institute, Pushchino, Russian Federation

^cShemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russian Federation

#e-mail: utkin@ibch.ru, yutkin@yandex.ru

Previously, it was shown that the non-conventional toxin WTX from the venom of the cobra *Naja kaouthia*, when administered intravenously, caused a decrease in blood pressure (BP) and an increase in heart rate (HR) in rats (Ogay et al., 2005). To identify the site of the toxin molecule responsible for these effects, we studied the influence of synthetic peptide fragments of the WTX on BP and HR in normotensive male Sprague Dawley rats under general anesthesia induced by Telazol and Xylazine. It was found that peptides corresponding to the WTX central polypeptide loop, stabilized by a disulfide bond, at intravenous injection at concentrations from 0.1 to 1.0 mg/ml caused a dose-dependent decrease in BP, the HR increasing only in the first 5–10 minutes after administration. Thus, WTX fragments corresponding to the central polypeptide loop reproduce the decrease in blood pressure caused by the toxin.

Keywords: non-conventional toxin, WTX, blood pressure, heart rate