Изучаване аналгетичните ефекти на нови хексапептидни аналози модифицирани с β^2-триптофан

А. Бочева, Х. Ночева, Н. Павлов, Е. Найденова

Analgesic effects of novel hexapeptide analogs modified with β^2-tryptophan: *Aiming to develop more potent analgesic substances a new series of β2-tryptophan modified at 4th and 5th position respectively Ac-RFMWMK-NH2 and Ac-RYYRWK-NH2 analogues was synthesized. Antinociceptive effects were evaluated by two nociceptive tests – the paw-pressure (PP) and the hot plate (HP), and statistically accessed by ANOVA. Both JTC-801 injected 10 min before the peptides and NaI injected 20 min before the peptides significantly decreased the analgesic effect of all the investigated peptides. We suggest that the analgesic effects of newly synthesized hexapeptide analogues are influenced by the nonselective opioid receptors inhibitor and the NOP-receptor inhibitor.*

Key words: *Hexapeptide analogs, β^2-tryptophan, SPPS, Paw-pressure (PP) , Hot plate (HP)*

ВЪВЕДЕНИЕ

Ноцицептин/Орфанин FQ (N/OFQ) представлява ендогенен лиганд на опиоидния пептиден ноцицептинов рецептор (NOP) и е свързан структурно и функционално с класическите опиоидни рецептори. Активацията на NOP N/OFQ модулира различни биологични ефекти на централно и периферно ниво [1,2]. Известно е, че N/OFQ притежава директен ефект върху болковата перцепция.

През последните години вниманието на изследователите е фокусирано върху аналгетичните ефекти на хексапептидните лиганди на NOP [3,4].

Синтезирана бе серия от нови аналози на Ac-RFMWMK-NH_2 и Ac-RYYRWK-NH_2 модифицирани съответно в позиция 4 и 5 с новосинтезирани β^2-триптофанови аналози. Тази неприродна амино киселина беше синтезирана чрез асиметрично алкилиране по *Friedel-Crafts* на различни индоли с хирален нитроакрилат до получаване на оптично активни β-триптофанови производни [5]. Хексапептидните аналози синтезирахме чрез твърдофазен метод за пептиден синтез по Fmoc – стратегия.

Целта на настоящето изследване бе да изучим: а) аналгетичните ефекти на новосинтезираните ноцицептинови аналози; б) участието на ноцицептиновата (JTC-801-антагонист на ноцицептиновия рецептор) и опиоидергична системи (налоксон-антагонист на опиоидните рецептори) в аналгетичните им ефекти.

ИЗЛОЖЕНИЕ

Материали и методи

Животни

Опитите бяха проведени върху мъжки бели плъхове порода Wistar (180-200г), отглеждани при цикъл 12ч тъмно/12ч светло със свободен достъп до храна и вода. Всяка група съдържаше по 6 животни. Всички опити бяха проведени между 9.00 и 12.00ч. Опитите бяха извършени съгласно изискванията на Международната асоциация за изследване на болката и ЕКНМ към МУ- София.

Аналгетични методи

Метод с прилагане на механично дразнене paw pressure (PP) тест и метод с прилагане на термично дразнене hot plate (HP) тест.

Всички вещества бяха разтворени във физиологичен разтвор и инжектирани интраперитонеално. Изследваните пептиди (2 референтни вещества и 4 аналога) бяха въвеждани в доза 10 μg/kg. JTC-801 бе въвеждан в доза 0.5 mg/kg, а налоксонът в доза 1 mg/kg.

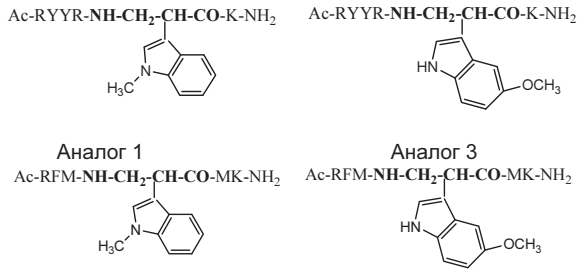
JTC-801 бе прилаган 10 мин, а налоксонът 20 минути, преди въвеждането на всеки един от пептидите.

Статистика

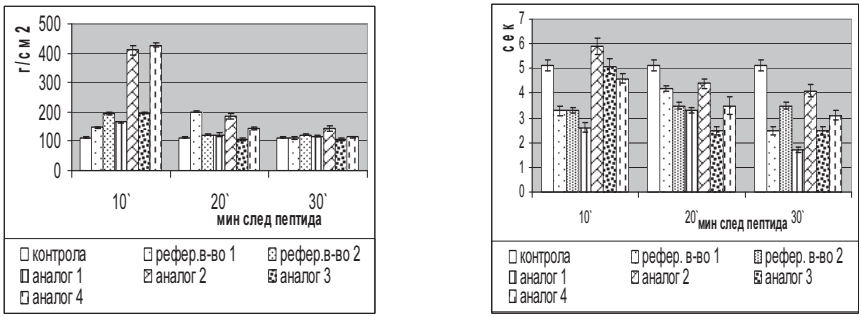
Резултатите са обработени с ANOVA и са представени като средноаритметични стойности и стандартните им грешки.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Измерванията започваха 10 мин. след инжектиране на изследваните пептиди. Въведени самостоятелно референтните вещества показаха тенденция към повишаване на PP-прага, по-силно изразена при Ac-RFMWMK-NH2. Неговите аналози, вещества 2 и 4 показаха статистически достоверно повишение на PP-прага, отчетено на 10^{та} минута от изследването, спрямо контролите и самите референтни вещества (фиг. 1). На 20 ^{та} минута бе отчетено понижение на болковия праг за посочените два аналога (фиг. 2 А).



Фиг. 1 Химически структури на изследваните аналози на Ac-RFMWMK-NH2, модифицирани в 4^{та} позиция (Аналог 2 и Аналог 4) и на Ac-RYYRWK-NH$_2$, модифицирани 5 ^{та} позиция (Аналог 1 и Аналог 3).



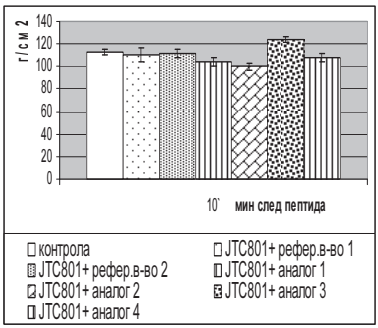
2А **2Б**

Фиг. 2 Ефекти на новосинтезираните аналози и референтните вещества върху болковата перцепция, отчетени чрез измерване на PP-прага (А) и HP-латенцията (Б). Данните са представени чрез x ±S.E.M.

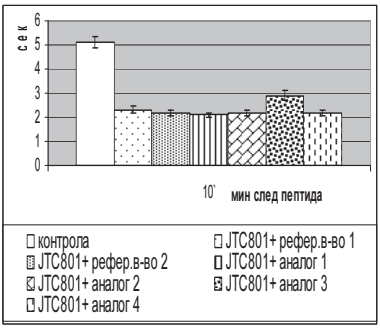
При определяне на НР-латенцията референтните вещества показаха статистически достоверно по-ниски стойности спрямо контролите през целия период на изследването (фиг.2 Б).

Аналозите 2, 3 и 4 показаха статистически достоверно удължаване на НР-латенцията в сравнение с тази на референтните вещества на 10 ^{та} минута, като аналог 2 показа тенденция към удължаване на НР-латенцията и спрямо контролните стойности. На 20^{та} и 30^{та} минута всички изследвани вещества показаха стстистически достоверно скъсяване на НР-латенцията, отчетено спрямо интактните животни (фиг.2 Б).

При претретиране на животните с JTC-801 (антагонист на NOP-рецептора) стойностите на болковия праг при РР-теста бяха съизмерими с контролните, както за референтните вещества, така и за аналози 1, 2 и 4. Единствен аналог 3 показа тенденция към повишаване на РР-прага на 10^{та} минута, отчетено спрямо контролите от референтните вещества (фиг. 3А).



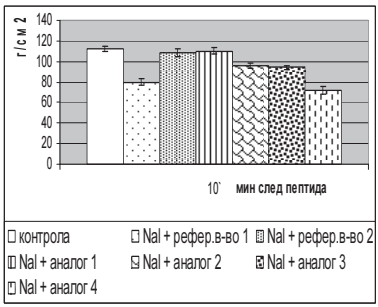
3А



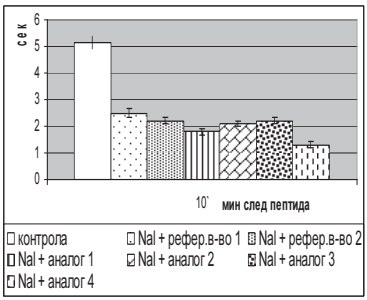
3Б

Фиг. 3 Ефекти на новосинтезираните аналози и референтните вещества върху болковата перцепция след претретиране на животните с антагониста на NOP-рецептора JTC801, отчетени чрез измерване на РР-прага (А) и НР-латенцията (Б) . Данните са представени чрез x ±S.E.M.

При НР теста се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на НР-латенцията и тенденция към хипералгезия, отчетена за всичките изследвани вещества спрямо контролните стойности (фиг. 3Б).



4А



4Б

Фиг. 4 Ефекти на новосинтезираните аналози и референтните вещества върху болковата перцепция след претретиране на животните с налоксон, отчетени чрез измерване на РР-прага (А) и НР-латенцията (Б) . Данните са представени чрез x ±S.E.M.

Претретирането на животните с налоксон (антагонист на опиоидните рецептори) показа статистически достоверно понижение на болковият праг за референтно вещество 1 и аналог 4. При останалите изследвани пептида стойностите бяха съизмерими с контролните (фиг. 4А).

При НР теста се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на НР-латенцията за всички изследвани вещества, в сравнение с тази на контролните стойности (фиг. 4Б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получените резултати показаха, че аналозите на *Ac-RFMWMK-NH*$_2$ проявяват по-силен аналгетичен ефект спрямо аналозите на *Ac-RYYRWK-NH*$_2$ при РР-теста. Аналгетичният ефект е на 10^{та} минута от изследването.

Използваните два теста - paw pressure (PP) и hot plate (HP) подсказват, че в аналгетичните ефекти на изследваните пептиди са ангажирани централни механизми участващи в болковата перцепция.

В механизмите на аналгетичните ефекти на изследваните пептиди участват ноцицептиновия и опиоидните рецептори, което подсказва за влиянието на ноцицептиновата и опиоидергична системи

Изследването е осъществено благодарение на Договор ДТК 02/61 с Националния Фонд за научни изследвания , България.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Calo G., R. Guerrini, A. Rizzi, S. Salvadori, D. Regoli. *Br. J. Pharmacol*. 2000, *129(7)*, 1261.

[2] Heinricher, M. *Life Sci.* 2003, *73*, 813.

[3] Dooley, C., Spaeth, C., Berzetei-Gurske, I., et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997, *283(2)*, 735.

[4] Ambo, A., Kohara, H., Kawano, S., Sasaki, Y. *J. Pept. Sci.* 2007, *13*, 672.

[5] Pavlov, N.; Gilles,P.; Didierjean, C.; Wenger, E.; Naydenova, E.; Martinez, J.; Calmès, M. *J. Org. Chem.*, 2011, *76*, 6116.

За контакти:

Проф. д-р Емилия Найденова, Катедра “Органична химия”, Департмент по химични науки, Химикотехнологичен и металургичен университет, тел.: 02-8163 425, e-mail: e_naydenova@abv.bg

Докладът е рецензиран.