Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ГНЦ ИБХ РАН)

На правах рукописи

Калиновский Александр Павлович

Идентификация, механизм действия и биологическая активность 14-дезокси-11,12-дидегидроандрографолида, нового природного ингибитора канала TRPV3

1.4.9 – Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
Андреев Ярослав Алексеевич

Москва – 2026

Оглавление

Оглавление 2

Введение 5

1. Обзор литературы 10

1.1 Надсемейство TRP и семейство ванилоидных TRPV каналов 10

1.2 Структурная характеристика TRPV3 11

1.3 Тепловая активация TRPV3 14

1.4 Обзор лигандов TRPV3 16

1.4.1 Природные активаторы 16

1.4.2 Синтетические активаторы 19

1.4.3 Природные ингибиторы 19

1.4.4 Синтетические ингибиторы 23

1.4.5 Иные модуляторы TRPV3 24

1.5 Структурные особенности взаимодействия TRPV3 с лигандами 25

1.6 Функции TRPV3 в нормальных и патологических процессах 28

1.6.1 Хемо- и термочувствительность 28

1.6.2 Боль 29

1.6.3 Другие функции в нервной системе 32

1.6.4 Зуд, дерматит и кожное воспаление 33

1.6.5 Синдром Олмстеда 37

1.6.6 Заживление ран и барьерные функции кожи 40

1.6.7 Формирование волосяного покрова 40

1.7 Резюме 41

2. Материалы и методы 43

2.1 Материалы 43

2.1.1 Реактивы и расходные материалы 43

2.1.2 Наборы реактивов 43

2.1.3 Оборудование 44
2.1.4 Биологические материалы и животные 45
2.1.5 Микробиологические среды....45
2.1.6 Программное обеспечение 45
2.2 Методы....46
2.2.1 Экстракция и выделение активного соединения 46
2.2.2 Установление структуры 46
2.2.3 Сайт-направленный мутагенез....46
2.2.4 Синтез кРНК 47
2.2.5 Ведение клеточных культур....47
2.2.6 Экспрессия каналов в CHO и получение стабильных линий 47
2.2.7 Флуоресцентный кальциевый тест 48
2.2.8 Флуоресцентный кальциевый имиджинг 48
2.2.9 Записи токов от клеток CHO....49
2.2.10 Записи токов от ооцитов Xenopus laevis 49
2.2.11 Анализ концентрационных зависимостей 50
2.2.12 Тестирование тепловой активации....50
2.2.13 Анализ тепловой активации 51
2.2.14 Тестирование на цитотоксичность 52
2.2.15 Молекулярный докинг....52
2.2.16 Поведенческие модели зуда 53
3. Результаты и обсуждение 55
3.1 Выделение и идентификация 14-дезокси-11,12-дидегидроандрографолида....55
3.1.1 Фракционирование и скрининг экстрактов 55
3.1.2 Идентификация активного компонента A. paniculata....56
3.2 Активность DDA in vitro 60
3.2.1 Селективность действия 60
3.2.2 Действие на ионные токи в клетках hTRPV3-CHO 61

3.2.3 Действие на приток кальция в кератиноцитах 63

3.2.4 Различное действие на 2-APB- и CBD-опосредованную активацию TRPV3 63

3.2.5 Действие DDA на токи в ооцитах лягушки, экспрессирующих TRPV3.....66

3.3 Тепловая активация TRPV3 70

3.3.1 Сравнительная кинетика активации TRPV1 и TRPV3 под действием тепла.....70

3.3.2 Сравнительная термодинамика активации TRPV1 и TRPV3 под действием тепла 73

3.3.3 Действие DDA на тепловую активацию TRPV3 74

3.4 Молекулярный механизм действия DDA на TRV3 76

3.4.1 Структурное взаимодействие CBD и TRPV3 76

3.4.2 Структурное взаимодействие DDA и TRPV3.....80

3.4.3 Модальная селективность действия DDA 83

3.5 Цитотоксичность и биологическая активность DDA на животных 86

3.5.1 Цитотоксичность 86

3.5.2 Эффект DDA в модели зуда, вызванного карвакролом 86

3.5.3 Эффект DDA в модели зуда, вызванного гистамином 89

Выводы 93

Благодарности 94

Список сокращений 95

Список литературы 97

Введение

Актуальность и степень разработанности темы

TRP каналы представляют собой группу мембранных катионных каналов, изучение которых имеет большое фундаментальное и прикладное значение, обусловленное их участием в нормальных и патологических процессах. Значительный интерес исследователей вызывает семейство ванилоидных TRP каналов (TRPV), объединяющее шесть представителей TRPV1-6. Первым клонированным представителем был канал TRPV1, который является рецептором капсаицина, острого компонента красного перца чили, а также ключевым участником в восприятии тепла и развитии воспалительной боли. В 2002 году сразу в трех независимых публикациях [1–3] было заявлено о клонировании и исследовании функции гомологичного термочувствительного канала TRPV3. Согласно современным данным, TRPV3 стоит в одном ряду с отдельными представителями TRP каналов, называемыми термо-TRP каналами, функция которых заключается в детектировании температуры в физиологическом диапазоне. В частности, порог активации TRPV3 (около 31-39 ºC) находится в зоне безвредных температур (22–40 ºC) между «рецептором холода» TRPM8 и TRPV1 с порогом активации выше 42 ºC. За открытие молекулярных основ температурной и механической чувствительности, обусловленных термо-TRP и Piezo каналами, американские исследователи Дэвид Джулиус и Ардем Патапутян, были удостоены Нобелевской премии 2021 года, что, очевидно, подчеркивает огромное значение этого научного направления.

Исследования показывают, что TRPV3 обильно представлен в кератиноцитах, составляющих основную массу эпидермиса. Физиологическая роль TRPV3 в коже двояка. С одной стороны, он принимает участие в температурной чувствительности, поддержании и функционировании кожного барьера, заживлении ран и морфогенезе волосяного покрова, с другой стороны, опосредует развитие воспалительных кожных заболеваний. В нормальных физиологических условиях умеренная активация TRPV3 ускоряет миграцию кератиноцитов, регенерацию кожи, восстановление волосяных стержней. С этой позиции, актуальными для разработки в качестве терапевтических/косметических средств являются умеренные или слабые активаторы канала. В то же время, экспрессия TRPV3 повышается в условиях нарушения целостности кожного покрова, атопического дерматита, поражений кожи, вызванных акне, и в послеожоговых шрамах. При воспалительном процессе проводимость TRPV3 может повышаться за счет прямого действия арахидоновой кислоты, которая является предшественником воспалительных медиаторов. Чрезмерная

химическая активация TRPV3 приводит к кожным воспалительным проявлениям. Мутации TRPV3 с усилением функции являются причиной синдрома Олмстеда, который характеризуется инвалидизирующим ороговением кожи, болью и зудом. Применяемые в медицинской практике препараты для терапии синдрома Олмстеда, а также хронического зуда, который сопровождает атопический дерматит и другие кожные заболевания, являются либо симптоматическими с частичным и временным эффектом, либо имеют непрямое действие на TRPV3 (например, ингибиторы EGRF). С этой точки зрения, непосредственное ингибирование TRPV3 может обладать более высоким терапевтическим эффектом. Фармацевтические компании и научные группы в мире активно занимаются разработкой низкомолекулярных активаторов и ингибиторов TRPV3, однако среди молекул, раскрытых в научной литературе, представлено мало соединений, обладающих достаточной эффективностью и высоким терапевтическим индексом.

Экстракты растений представляют собой огромные библиотеки биологически активных молекул, что мотивирует поиск в их составе новых высокоселективных соединений, применение которых in vivo сопровождалось бы минимальным развитием побочных эффектов. При этом растительные экстракты, которые используются в традиционной медицине в качестве противовоспалительных и ранозаживляющих средств, активно изучаются на предмет активности к каналам TRPV3. В результате проведенного ранее скрининга, мы обнаружили у экстракта андрографиса метельчатого (*Andrographis paniculata)* активность по отношению к TRPV3. Таким образом, замысел настоящей диссертации состоял в комплексном изучении активного начала этого экстракта.

Цель и задачи

Целью работы являлся поиск и исследование биологической активности природного модулятора TRPV3 из андрографиса метельчатого *(Andrographis paniculata)*.

Задачи:

1. Выделение и структурная характеристика активного компонента экстракта андрографиса метельчатого (*Andrographis paniculata*);

2. Исследование функциональной активности и селективности активного соединения по отношению к TRPV3;

3. Изучение структурных основ взаимодействия активного соединения с TRPV3;

4. Оценка биологической активности активного соединения в моделях на животных.

Научная новизна и практическая значимость работы

В экстракте лекарственного растения *Andrographis paniculata* обнаружен ингибитор канала TRPV3 14-дезокси-11,12-дидегидроандрографолид (DDA), представляющий собой мономерный дитерпеноид лабданового типа, производное андрографолида. Для этого структурного типа молекул (хемотипа) впервые показана ингибирующая активность по отношению к TRPV3.

Впервые изучена активность DDA к TRPV3 в гетерологичных и нативной системах экспрессии и показано, что действие DDA является селективным и высокоаффинным (IC_{50} 7 нМ при активации каннабидиолом (CBD), ~0,8 μM при активации 2-аминоэтоксидифенилборатом (2-APB)). Подобная активность ставит DDA в один ряд с наиболее активными ингибиторами TRPV3 из известных. Впервые обнаружен феномен модально-селективной модуляции канала TRPV3 под действием DDA, характер которой зависит от типа активирующего стимула. Впервые локализован общий сайт связывания DDA и активатора каннабидиола в ванилоидном сайте трансмембранной области TRPV3. Эти результаты расширяют фундаментальные представления о структурной организации взаимодействий TRPV3 с лигандами и открывают возможность для рационального дизайна производных молекул с тонкой настройкой фармакологических свойств.

Впервые проведено изучение противозудного действия DDA, в котором соединение показало высокую активность, сопоставимую по силе действия с современным антигистаминным препаратом. Эти результаты позволяют дать высокую оценку терапевтическому потенциалу DDA и закладывают основу для выбора оптимального дизайна доклинических испытаний.

Методология и методы исследования

Методологическую основу работы составил комплексный подход, включающий современные химические и биологические методы. Выделение активного компонента опиралось на фракционирование экстрактов с параллельным биотестированием. Установление структуры осуществлялось с помощью спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения. Исследование биологической активности in vitro проводилось с помощью методов электрофизиологии и кальциевой флуометрии. Установление структурного механизма осуществлялось с помощью методов in silico и валидацией на мутантных каналах. Биологическая активность на животных изучалась в поведенческих моделях, валидированных ранее в независимых исследовательских группах.

Положения, выносимые на защиту

1. Из лекарственного растения *Andrographis paniculata* был выделен новый ингибитор ионного канала TRPV3, идентифицированный как дитерпеноид лабданового типа 14-дезокси-11,12-дидегидроандрографолид (DDA).

2. DDA проявляет модально-селективное действие с высокой (наномолярной) активностью: выступает как конкурентный обратимый антагонист при активации каннабидиолом, негативный аллостерический модулятор при активации 2-APB и не влияет на активацию канала теплом.

3. Участком связывания DDA является ванилоидный карман трансмембранной области TRPV3, который также идентифицирован как сайт действия каннабидиола.

4. DDA оказывает выраженную противозудную активность в моделях на животных.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая достоверность представляемых результатов опирается на использовании современных подходов и оборудования для решения поставленных задач. Эксперименты проводились как минимум в трех независимых биологических повторностях и были проанализированы с применением подходящих статистических тестов и математических моделей. Достоверность результатов подтверждается использованием комбинации независимых методов, например, ЯМР и масс-спектрометрии для установления структуры, электрофизиологии и кальциевой флуометрии для анализа активности, молекулярного докинга и валидацией на мутантных каналах и др. Полученные данные не противоречат общепризнанным представлениям о фармакологических свойствах TRPV3, но существенно дополняют их.

Результаты опубликованы в статьях:

1. **Kalinovskii A.P.**; Osmakov D.I.; Korolkova Y. V; Sobolevsky A.I.; Andreev Y.A. Vanilloid site-mediated TRPV3 activation by cannabidiol and potent inhibition by 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide // Cell Calcium. – 2026. – Vol. 138., No. 10320.

2. **Kalinovskii A.P.**; Logashina Y.A.; Palikova Y.A.; Palikov V.A.; Osmakov D.I.; Mineev K.S.; Belozerova O.A.; Shmygarev V.I.; Kozlov S.A.; Dyachenko I.A.; Korolkova Y. V.; Andreev Y.A. A Diterpenoid of the Medicinal Plant Andrographis paniculata Targets Cutaneous TRPV3 Channel and Relieves Itch // J. Nat. Prod. – 2024. – Vol. 87, No. 7. – P. 1852–1859.

3. **Kalinovskii A.P.**; Utkina L.L.; Korolkova Y. V.; Andreev Y.A. TRPV3 Ion Channel: From Gene to Pharmacology // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – Vol. 24., No. 10. – P. 1–22.

Результаты были представлены на конференциях: Biologically active compounds: From chemistry to medicine (Ташкент, Узбекистан, 2026); The 9th International Conference on

Chemistry, structure and function of biomolecules (Минск, Беларусь, 2026); школе-конференции «Инженерия живых систем — достижения и перспективы» к 25-летию кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, 2025); международной научной конференции, посвященной 120-летию со дня рождения академика А.Н. Белозерского и 90-летию со дня рождения академика В.П. Скулачёва НИИ ФХБ – МГУ (Москва, 2025); XXXV Зимней молодёжной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (ГНЦ ИБХ РАН, Москва, 2023); IX Международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков (Кольцово, Новосибирск, 2022).

Часть работы выполнена при поддержке успешно завершенного гранта Российского научного фонда № 22-25-00136.

Личный вклад автора

Все представленные результаты получены автором лично, либо при его непосредственном участии в Лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ГНЦ ИБХ РАН. Установление химической структуры проводилось совместно с сотрудниками ИБХ К. С. Минеевым, О.А. Белозеровой и В.И. Шмыгаревым. Эксперименты на животных проводились в филиале ИБХ в г. Пущино (ФИБХ) в Лаборатории биологических испытаний В.А. Паликовым и Ю.А. Паликовой под руководством И.А. Дьяченко. Структурное взаимодействие CBD и DDA с TRPV3 изучалось в сотрудничестве с А.И. Соболевским (Колумбийский университет, Нью-Йорк, США).

1. Обзор литературы

1.1 Надсемейство TRP и семейство ванилоидных TRPV каналов

TRP каналы составляют надсемейство (superfamily) катионных каналов. Их структурная организация принципиально схожа и представлена в виде ансамбля из субъединиц, содержащих шесть трансмембранных сегментов. Исходя из современных представлений, можно утверждать, что TRP каналы могут выполнять, как минимум три различные функции:

1. роль сенсоров, способных интегрировать физические и химические внеклеточные стимулы для передачи сигнала;

2. роль эффекторов, которые находятся под управлением внутриклеточных сигналов от других рецепторов;

3. редкая роль каналов-ферментов для представителей, содержащих киназный домен (TRPM6 и TRPM7).

Активация TRP каналов может происходить в ответ на температуру, pH, осмолярность, экзогенные химические агенты, внутриклеточный кальций, фосфатидилинозитол и др. Согласно современной классификации IUPHAR, надсемейство TRP объединяет семь семейств, выделяемых на основании гомологии аминокислотных последовательностей: TRPC (канонические), TRPV (ванилоидные), TRPM (меластатиновые), TRPP (полицистиновые), TRPML (муколипиновые), TRPA (анкириновые), TRPN (NOMPC-подобные). В семействе TRPV также выделяют две подгруппы: неселективных катионных каналов TRPV1-TRPV4 и селективных к кальцию каналов TRPV5-TRPV6 [4].

1.2 Структурная характеристика TRPV3

На сегодняшний день, структурная организация TRPV3 изучена довольно подробно [5–12]. Зрелый TRPV3 представляет собой тетрамер с симметрией четвертого порядка (Рисунок 1). Зрелая полипептидная цепь отдельной субъединицы TRPV3 мыши и человека состоит из 790-791 аминокислот в зависимости от варианта сплайсинга [1–3]. В зрелом фолдированном виде каждая субъединица имеет трансмембранную область (иногда называемую доменом, TMD), который включает шесть трансмембранных α-спиральных сегментов (S1–S6). Первые четыре сегмента образуют пучок, составляющий домен S1–S4, также известный как "домен, подобный сенсору потенциала" (voltage-sensor-like). S5 и S6 с поровой петлей образуют поровый домен. Подобная архитектура трансмембранной области указывает на структурное сходство TRP каналов с потенциал-управляемыми калиевыми каналами (K_V). TMD – наиболее консервативная область TRP каналов, в то время как N- и C-концы демонстрируют значительную вариативность среди отдельных семейств [13]. N- и C-концы TRPV3, обращенные в сторону цитоплазмы, составляют большую часть белка и имеют мультидоменную организацию.

N-конец содержит домен, содержащий шесть анкириновых повторов (ARD), за которым следует линкерный домен ARD-TMD, включающий β-шпильку, состоящую из β-тяжей β1 и β2, и мотив спираль-поворот-спираль, состоящий из линкерных спиралей, LH1 и LH2 [5]. Каждый анкириновый повтор представляет собой мотив из 33 аминокислотных остатков, образующих две антипараллельные α-спирали, разделенных поворотом и петлей. C-конец TRPV3 содержит β-тяж (β3), так называемый C-концевой крюк и амфипатическую TRP спираль, параллельную TMD. C-концевой крюк, состоящий из 19 остатков, уникален для TRPV3 и не обнаружен в других TRP каналах. β3 C-конца соединяется водородными связями с β-шпилькой в линкерном домене N-конца, образуя трехцепочечный β-лист, который вместе с C-концевым крюком участвует в межсубъединичных взаимодействиях с ARD и стабилизирует элементы внутриклеточных доменов вместе [1–3,8,14,15].

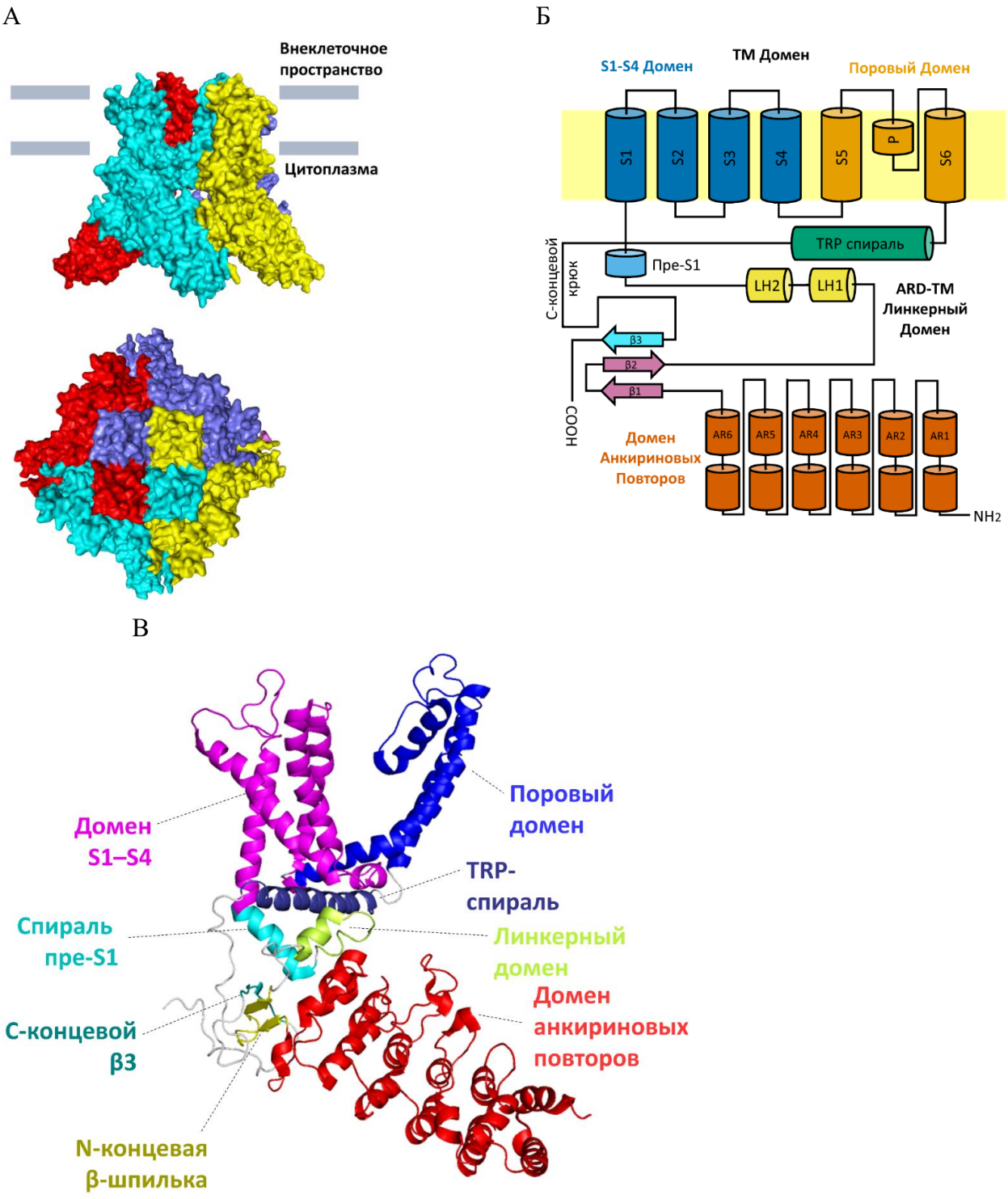


Рисунок 1. Структура TRPV3. (А) Криоэлектронная структура мышиного TRPV3 в закрытом апо-состоянии (PDB: 6DVW). Вид сбоку и сверху. (Б) Архитектура отдельной субъединицы TRPV3 в виде топологической диаграммы. (В) Структурная организация отдельной субъединицы с картированием структурных элементов.

TRPV3 – неселективный катионный канал, который приблизительно в 12 раз более проницаем для Ca^{2+}, чем для других катионов ($Ca^{2+} > Na^{+} \approx K^{+} \approx Cs^{+}$) [1]. Ионный путь в TRPV3 в закрытом состоянии имеет различную полярность в зависимости от участка поры. Модуль внешней поры, который включает селективный фильтр, выстлан исключительно гидрофильными остатками и карбонильными группами основной цепи. Эта область достаточно широка для прохождения гидратированных катионов. В то же время внутренняя область поры, которая включает центральную полость и внутриклеточные ворота, полностью выстлана гидрофобными остатками. Наиболее узкое место внутренней поры образовано остатками изолейцина (I674) [5,12]. Такое устройство ионного пути разительно отличается от TRPV1, который имеет верхние и нижние ворота [16].

Имеется недавнее сообщение об уникальном для TRP каналов пентамерном состоянии TRPV3, которое было обнаружено в рекомбинантных препаратах при помощи высокоскоростной атомно-силовой микроскопии и криоэлектронной микроскопии. В пентамерном ансамбле пора канала открыта и расширена до радиуса проницаемого для больших катионов ($NMDG^{+}$, $Tris^{+}$, MAE^{+}). Предполагается, что пентамерное состояние с расширенной порой может служить объяснением особенности канала, которая заключается в значительном увеличении проводимости при длительной стимуляции сильными химическими активаторами (в частности, дифенилбороновым ангидридом) или продолжительным воздействием тепла. При этом, наличие или отсутствие пентамерных каналов в физиологических условиях в клетке пока не было показано [17,18].

1.3 Тепловая активация TRPV3

Воротный механизм TRPV3 может управляться термическими и химическими стимулами. В этом разделе рассмотрены структурно-функциональные особенности тепловой активации, а особенности химической активации канала рассмотрены в разделах ниже.

Известно, что отдельные TRP каналы обеспечивают терморецепцию у животных и выделяются в группу термо-TRP каналов (thermo-TRPs). Согласно современным представлениям, в эту группу включают девять представителей: TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM3, TRPM8, TRPC5, TRPA1. Белковая структура термо-TRP каналов обладает высокой чувствительностью к изменению температуры, которая выражается в резком увеличении вероятности открытого состояния при изменении температуры (параметр Q_{10}). Q_{10} для термо-TRP имеет двузначные значения и во много раз превосходит подобный показатель у большинства других ионных каналов, равный 1-3 [19], или ферментов (в аналогичном выражении для скорости ферментативной реакции) [1–3,20–26]. Соответственно, активация TRPV3 под действием тепла высоко чувствительна к температуре с Q_{10} ~20-65. Также тепловая активация TRPV3 сопровождается огромным изменением энтальпии (ΔH = 91,2 ккал/моль) и энтропии (ΔS = 287,5 кал/(моль*К)), что свидетельствует о массивных структурных перестройках белка [20,27].

TRPV3 активируется теплом в безвредном диапазоне температур (innocuous), в отличие от TRPV1, который активируется в болевом (noxious) диапазоне температур (выше 42 ^{o}C) [20,27]. Порог активации TRPV3 находится в диапазоне 31-39 °C, который варьируется в зависимости от экспериментальных условий: скорости изменения температуры и того, какой по счету стимул [2,3,9,28]. Повторные активации как нативного, так и гетерологично экспрессируемого TRPV3 приводят к увеличению проводимости канала (сенситизации). Это свойство уникально в сравнении с другими TRP каналами, которые демонстрируют времезависимую десенситизацию при длительной стимуляции [1,2,29–31]. Первоначальная температурная активация TRPV3 может потребовать довольно высокой температуры (>50 °C), и впоследствии TRPV3 активируется при более низких температурах (>33 °C). Таким образом, для TRPV3 наблюдается гистерезис, т.е. канал «запоминает» предыдущие стимуляции и его поведение определяется предшествующим состоянием [32]. Сенситизация TRPV3 проявляет зависимость от кальция, который связывается с остатком D641 в поровой петле, а также регулируется кальмодулином, действующем на N-конце канала [31]. При этом,

сенситизация TRPV3 является внутренним свойством, которое присуще самому белку, что было показано в экспериментах на одиночных каналах [9,32]. Также показано, что открывание TRPV3 под действием тепла и некоторых сильных химических активаторов бифазно. Сперва наблюдается фаза с постепенно растущим током, а далее наблюдается фаза, в которой проводимость резко увеличивается, теряется обратное выпрямление, селективность к катионам, чувствительность к температуре и потенциалу [33]. Вторая функциональная фаза предположительно объясняется расширением поры, явлением, которое описывалось для каналов P2X [34], TRPV1 и некоторых других TRP каналов [35].

Структурные изменения, происходящие с TRPV3, под действием тепла были охарактеризованы с помощью крио-электронной микроскопии [9]. В образцах TRPV3, реконструированных в липидные нанодиски, которые были подвергнуты многократным (до сорока) стимуляциям температурой 42 ºC, наблюдали три структурных класса, в зависимости от использованного типа нанодиска: закрытое, сенситизированное и открытое. Сенситизированное состояние обладало полуоткрытой непроводящей порой с расширенным фильтром селективности, но суженными воротами из остатков I674. Предполагается, что сенситизированное состояние является промежуточным между закрытой и открытой конформациями. Переход от закрытого к сенситизированному состоянию высоко чувствителен к температуре и сопровождается освобождением ванилоидного кармана от мембранного фосфолипида, а также значительными изменениями пространственного положения и вторичных структур отдельных элементов белка: петли между S2 и S3-сегментами, в которой нарушается α-спиральная структура, C-концевой части, которая переходит из неупорядоченного состояния в α-спирализованное, и N-концевой части, которая «прижимается» к межсубъединичному интерфейсу. Тепловая стимуляция вызывает так называемую конформационную волну открытия канала, под которой понимаются высококооперативные структурные изменения, распространяющиеся от одной области белка к другой. Конформационная волна затрагивает ванилоидный сайт, линкеры S2–S3 и S4–S5, поровый домен, TRP-спираль, линкерный домен, β-лист, петли домена анкириновых повторов, N- и C-концы. Кооперативность (взаимозависимость) изменения конформаций различных доменов может служить объяснением, почему многочисленные аминокислотные замены по всему каналу изменяют тепловую чувствительность, т.е. почему сложно идентифицировать конкретный домен, который берет на себя роль датчика температуры или триггера конформационной волны [9].

1.4 Обзор лигандов TRPV3

1.4.1 Природные активаторы

Ниже представлены химические структуры активаторов TRPV3 (Рисунок 2) и их активность (Таблица 1).

Таблица 1. Активность активаторов TRPV3. э/ф – электрофизиологическое тестирование, к.т. – флуоресцентный кальциевый тест, МСТ – микроскопический термофорез, Hs – человеческий TRPV3, Mm – мышиный, Rn – крысиный.

Соединение	Активность		Метод измерения активности	Ссылка
	Вид	EC50, мкМ		
Дифенилсодержащие соединения				
2-Аминоэтоксидифенил борат	Mm	28,3-165,8	э/ф	[29,33]
	Hs	78	к.т.	[36]
Дифенилбороновый ангидрид	Mm	64,1-85,1	к.т., э/ф	[33]
Дрофенин	Hs	207	к.т., э/ф	[36]
Другие синтетические соединения				
KS0365	Mm	5,08	к.т., э/ф	[37]
Монотерпены				
6-трет-бутил-м-крезол	Mm	370	э/ф	[38]
Карвакрол	Mm	490	э/ф	[38]
	Hs	438	к.т.	[36]
Тимол	Mm	860	э/ф	[38]
Цитраль	Mm	926	э/ф	[39]
Дигилрокарвеол	Mm	2570	э/ф	[38]
(-)-Карвеол	Mm	3030	э/ф	[38]
(+)-Борнеол	Mm	3450	э/ф	[38]
Камфора	Mm	6030	э/ф	[38]
(-)-Ментол	Mm	20000	к.т., э/ф	[40]
Сесквитерпены				
Фарнезилпирофосфат	Hs	0,1311	к.т., э/ф	[41]
Дитерпены				
Серратол	Rn	0,17	к.т.	[42]
Инсенсол ацетат	Mm	16	к.т., э/ф	[43]
Бисандрографолид B	Mm	40,5	ММТ, э/ф	[44]
Каннабиноиды				
DMH-Δ8-THC	Rn	0,14	к.т.	[45]
Каннабидиол (CBD)	Rn	3,7	к.т.	[46]
Δ9-тетрагидроканнабиварин (THCV)	Rn	3,8	к.т.	[46]

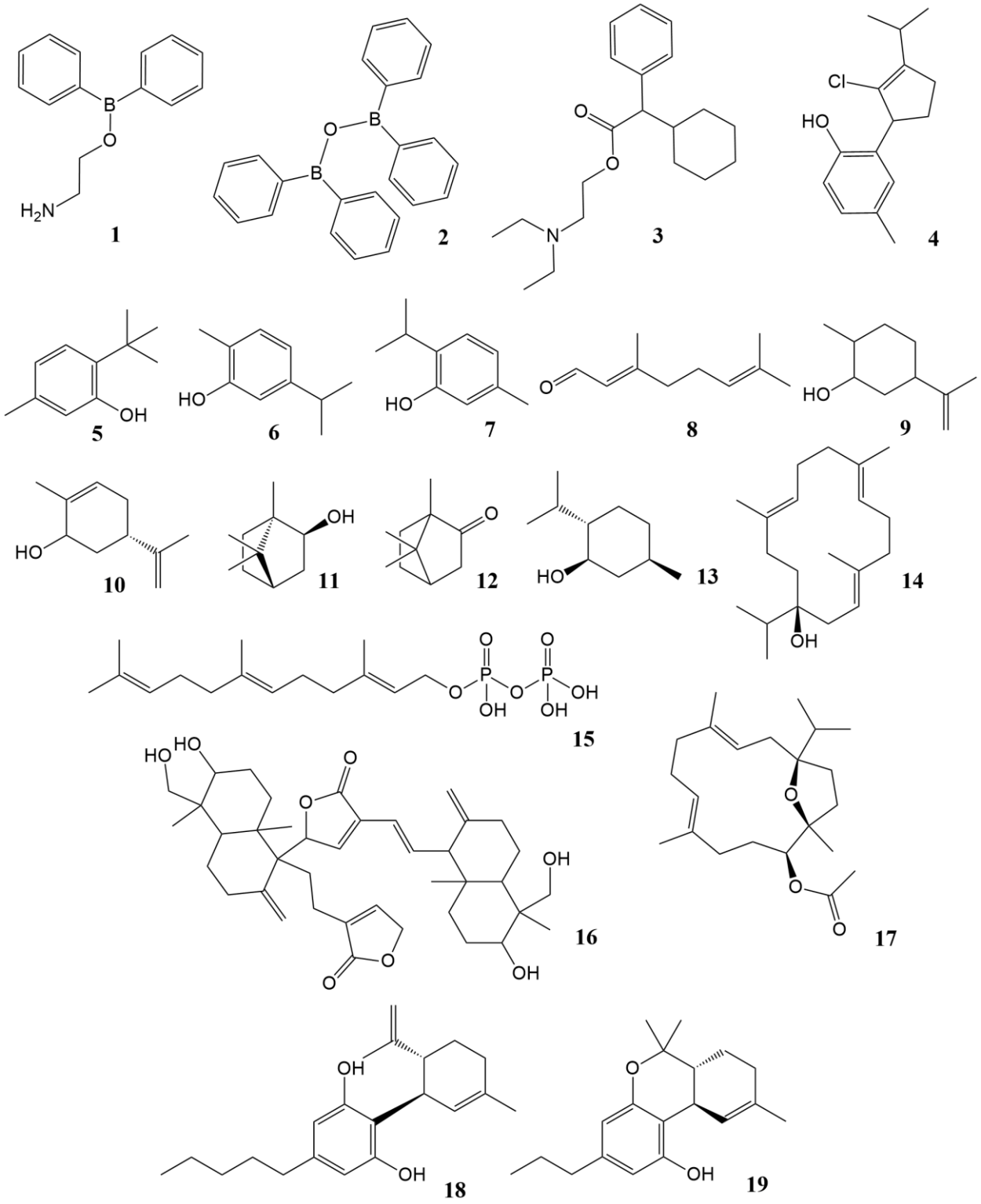


Рисунок 2. Структурные формулы активаторов TRPV3: 2-аминоэтоксидифенил борат (1), дифенилбороновый ангидрид (2), дрофенин (3), KS0365 (4), 6-трет-бутил-м-крезол (5), карвакрол (6), тимол (7), цитраль (8), дигидрокарвеол (9), (-)-карвеол (10), (+)-борнеол (11), камфора (12), (-)-ментол (13), серратол (14), фарнезилпирофосфат (15), бисандрографолид B (16), инсенсол ацетат (17), каннабидиол (18), Δ^9-тетрагидроканнабиварин (19).

Множество природных соединений проявляют агонизм по отношению к TRPV3. Примечательно, что большинство из них относятся к терпеноидам, природным веществам, состоящим из С5-изопреновых звеньев. Группа монотерпеновых агонистов TRPV3 включает компоненты эфирных масел, кожных сенсибилизаторов и аллергенов, например, тимол, карвакрол, камфора и др. (**5-13**, Рисунок 2) Взаимосвязь структуры и активности внутри группы монотерпенов была рассмотрена в исследовании [38], которое выявило важность вторичной гидроксильной группы для эффективной активации каналов. Монотерпеновые активаторы действуют на TRPV3 в высоких миллимолярных концентрациях и обладают низкой селективностью, действуя на различные другие TRP каналы.

Сесквитерпен фарнезилпирофосфат (**15**, Рисунок 2) был идентифицирован как первая эндогенная молекула, которая в наномолярных концентрациях активировала TRPV3 без какой-либо существенной активации других сенсорных TRP каналов. Химически родственные соединения фарнезол (спиртовая форма фарнезилпирофосфата), геранил и геранилгеранилпирофосфаты не активировали TRPV3 в микромолярном диапазоне [41], а изопентенилпирофосфат проявлял мощную антагонистическую активность [47].

Инсенсол ацетат (**17**, Рисунок 2), дитерпен из смолы босвеллии, или ладана, проявлял селективный и высокоактивный агонизм по отношению к TRPV3 [43]. Исследование взаимосвязи структуры и активности ряда производных инсенсола показало, что макроциклическое цембранное ядро может быть ответственным за селективное действие на TRPV3 и обладает высоким фармакологическим потенциалом. Особый интерес вызывает серратол (**14**, Рисунок 2), компонент индийского ладана, который был идентифицирован как субмикромолярный агонист TRPV3, обладающий большей активностью, чем инсензол ацетат [42]. Димерные энантиомерные лабдановые дитерпеноиды из лекарственного растения *Andrographis paniculata* показали способность активировать каналы TRPV1–4. Бисандрографолид B (**16**, Рисунок 2) показал наиболее прочное связывание с TRPV3, но он также связывался с TRPV1 с большей аффинностью [44].

Мощные активаторы TRPV3 были обнаружены среди каннабиноидов, группы терпенофенольных соединений, содержащихся в *Cannabis sativa*. Они наиболее известны как лиганды каннабиноидных рецепторов CB1 и CB2, но многие TRP каналы (TRPV1-V4, TRPA1, TRPM8) также являются их мишенями [48]. Каннабидиол и Δ9-тетрагидроканнабиварин (**18, 19**, Рисунок 2) проявляли мощный агонизм по отношению к

крысиному TRPV3, в то время как другие тестируемые каннабиноиды были менее активны, но могли значительно снижать чувствительность канала к дальнейшей стимуляции карвакролом. Действие этих каннабиноидов не являлось специфичным [46]. Синтетические модификации фитоканнабиноидов позволили получить агонисты TRPV3, обладающие большей активностью, однако высокой селективности достичь не удалось. Например, депентенил-α,α-диметилгептил-Δ8-тетрагидроканнабинол (DMH-Δ8-THC) активировал TRPV3 в субмикромолярных концентрациях, проявляя однако заметную активность по отношению к TRPA1 [45].

1.4.2 Синтетические активаторы

Важной группой активаторов TRPV3 являются дифенилсодержащие соединения, среди которых особое место занимает 2-аминоэтоксидифенилборат (2-APB) (**1**, Рисунок 2). 2-APB был первым обнаруженным нетепловым (химическим) активатором TRPV3, который вызывал устойчивую активацию и сенситизацию к теплу гетерологично экспрессированных каналов и эндогенных каналов в мышиных кератиноцитах [29]. 2-APB также воздействует на многочисленные мембранные TRP каналы канонического, меластатинового и ванилоидного семейств [49]. С момента введения в повсеместное использование в качестве активатора TRPV3 2-APB проявил себя в качестве ценного инструмента для анализа физиологии, структуры канала и идентификации антагонистов.

Дифенилбороновый ангидрид (DPBA, **2**, Рисунок 2) и дифенилтетрагидрофуран (DPTHF), структурно связанные с 2-APB, также модулируют функционирование канала: DPBA действует как агонист TRPV3, тогда как DPTHF проявляет выраженную антагонистическую активность [33]. Спазмолитическое средство дрофенин-HCl (**3**, Рисунок 2) проявляло селективный агонизм к TRPV3 с активностью, сравнимой с 2-APB, и не оказывало влияния на TRPA1, TRPM8, TRPV1, TRPV2 и TRPV4 в субмиллимолярных концентрациях. Дрофенин также оказывал цитотоксическое действие, превосходящее 2-APB и карвакрол [36].

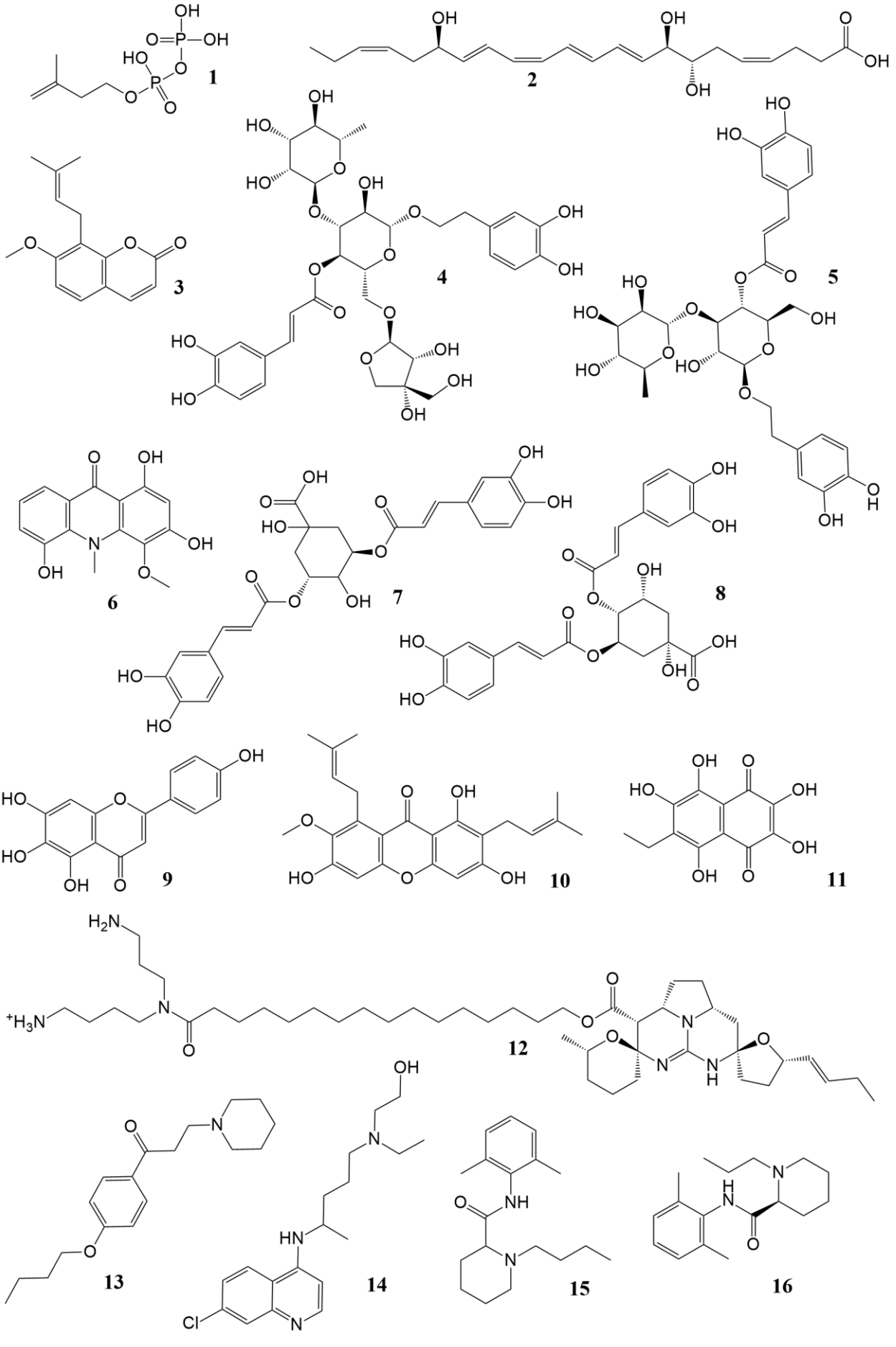
Новый синтетический активатор TRPV3 KS0365 (**4**, Рисунок 2) показал более высокую активность и эффективность, чем 2-APB. Соединение также действовало неселективно, действуя на каналы TRPV1 и TRPV2 и вызывая высвобождение внутриклеточного кальция в высоких концентрациях [37].

1.4.3 Природные ингибиторы

Ниже представлены ингибиторы TRPV3 (Рисунок 3) и их активность (Таблица 2).

Таблица 2. Активность ингибиторов TRPV3. э/ф – электрофизиологическое тестирование, к.т. – флуоресцентный кальциевый тест, Hs – человеческий TRPV3, Mm – мышиный.

Соединение	Активность		Метод измерения активности	Ссылка
	Вид	IC_{50}, мкМ		
Эндогенные соединения				
изопентенилпирофосфат	Hs	7,5	к.т., э/ф	[47]
17(R)-резолвин D1	Hs	0,398	к.т., э/ф	[50]
Соединения из медицинских растений				
остол	Hs	37	к.т., э/ф	[51]
	Mm	20,5	к.т., э/ф	[7]
форситозид B	Hs	6,7	к.т., э/ф	[52]
вербаскозид	Hs	14,1	э/ф	[53]
цитрусинин-II	Mm	12,43	к.т., э/ф	[54]
изохлорогеновая кислота A	Hs	2,7	к.т., э/ф	[55,56]
изохлорогеновая кислота B	Hs	0,9	к.т., э/ф	[55,56]
скутеллареин	Mm	1,18	э/ф	[57]
α-мангостин	Hs	0,077	к.т., э/ф	[58]
Соединения морского происхождения				
монанхомикалин B	Hs	3,25	к.т.	[59]
эхинохром A	Hs	2,11	э/ф	[60]
Лекарственные средства				
диклонин	Mm	3,2	э/ф	[61]
гидроксихлорохин	Hs	51,69	э/ф	[62]
бупивакаин	Hs	170	э/ф	[63]
ропивакаин	Hs	280	э/ф	[63]
Другие синтетические соединения				
7c	Hs	1,05	э/ф	[64]
8c	Hs	0,086	э/ф	[64]
74a	Hs	0,38	к.т., э/ф	[65]
рутениевый красный	Mm	-	к.т., э/ф	[3]
дифенилтетрагидрофуран	Mm	бифазное взаимодействие: 6-151,5 (-80 мВ); 10-226,7 (+80 мВ)	к.т., э/ф	[33]
26E01	Mm	8,6	к.т., э/ф	[66]
PC5	Mm	2,63	э/ф	[67]
трпвицин	Hs	0,41	э/ф	[68]


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

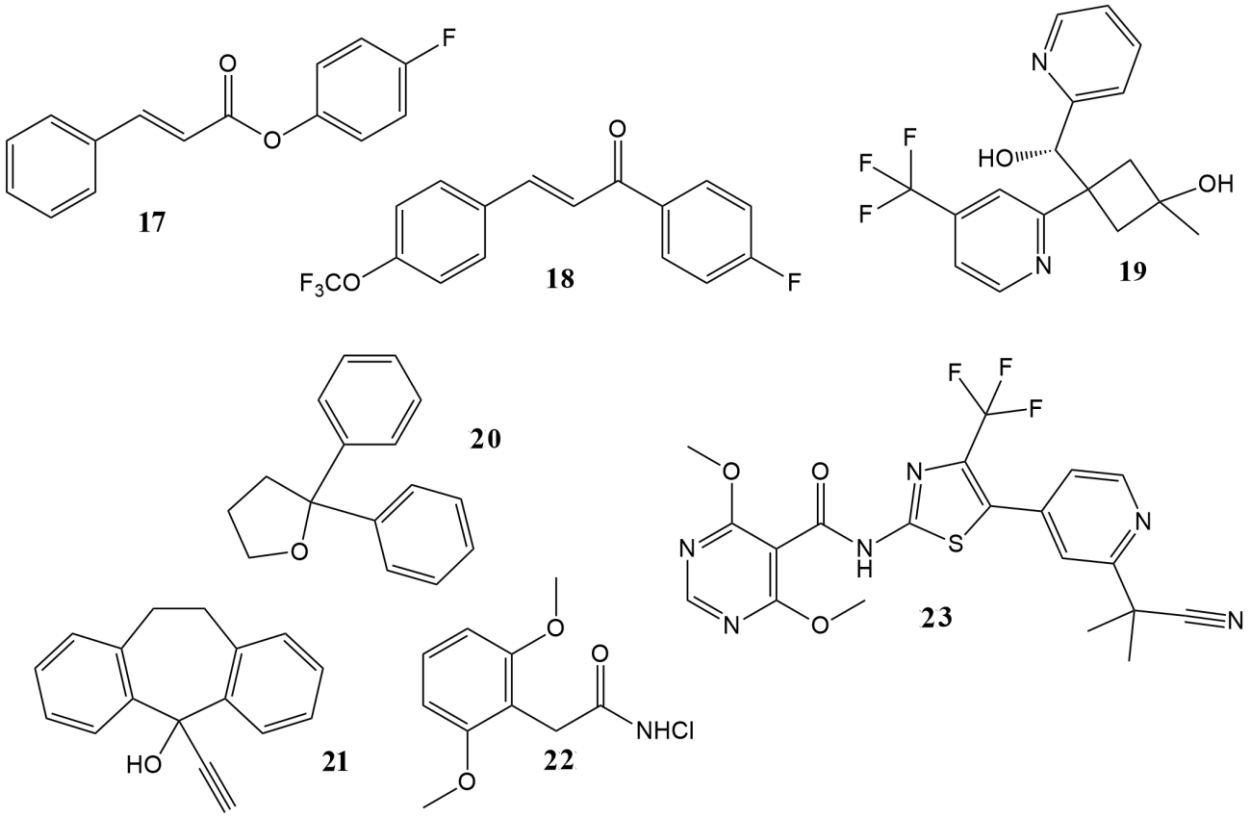


Рисунок 3. Структурные формулы ингибиторов TRPV3: изопентенилпирофосфат (1), 17(R)-резолвин D1 (2), остол (3), форситозид B (4), вербаскозид (5), цитрусинин-II (6), изохлорогеновая кислота A (7), изохлорогеновая кислота B (8), скутеллареин (9), α-мангостин (10), эхинохром A (11), монанхомикалин B (12), диклонин (13), гидроксихлорохин (14), бупивакаин (15), ропивакаин (16), 7c (17), 8c (18), 74a (19), дифенилтетрагидрофуран (20), 26E01 (21), PC5 (22), трпвицин (23).

Изопентенилпирофосфат (**1**, Рисунок 3), метаболический предшественник фарнезилпирофосфата, активатора TRPV3, продемонстрировал противоположный (ингибирующий) эффект на канал. Соединение действовало в микромолярных концентрациях, но дополнительно высокоактивно ингибировало TRPA1 [47]. Было показано, что эндогенный проразрешающий (противовоспалительный) липид, 17(R)-резолвин D1 (**2**, Рисунок 3), подавляет активацию TRPV3 в наномолярных концентрациях, проявляя селективность в сравнении с TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPA1, TRPM8 [50].

Лекарственные растения являются ценным источником ингибиторов TRPV3, различающихся по активности и химической природе. Профили селективности для представителей этой группы различны. Эффективное ингибирование TRPV3 было обнаружено для кумарина остола (**3**, Рисунок 3) из лекарственного растения *Cnidium monnieri* [51], однако с остолом взаимодействуют различные молекулярные мишени,

включая ионные каналы, например, TRPV1 [69], TRPA1 [70], хлоридный канал CFTR [71] и потенциал-зависимые натриевые каналы [72]. Скутеллареин (**9**, Рисунок 3), один из основных флавоноидов *Scutellaria baicalensis*, оказывал дополнительно небольшое ингибирующее действие на TRPV2 [57]. Ксантон из перикарпа плода мангостана α-мангостин (**10**, Рисунок 3) действовал дополнительно на TRPV1, TRPV4, TRPA1 [58]. Наибольшей селективностью среди растительных ингибиторов обладали изохлорогеновые кислоты A и B (**7**, **8**, Рисунок 3), изомеры дикафеоилхинной кислоты из травянистого растения *Achillea alpine* [55], фенилэтаноидный гликозид форситозид B (**4**, Рисунок 3), выделенный в качестве активного ингредиента травянистого растения *Lamiophlomis rotate* [73], и акридоновый алкалоид цитрусинин II (6, Рисунок 3), из растения *Atalantia monophylla* [54].

В ряду гуанидиновых алкалоидов морского происхождения была продемонстрирована неселективная ингибирующая активность в отношении TRPV3 [59,74–76]. Наиболее мощное действие было обнаружено у монанхомикалина B (**12**, Рисунок 3), алкалоида с пентациклическим ядром и спермидиновым фрагментом, выделенного из морской губки *Monanchora pulchra*. Соединение ингибировало TRPV1, TRPV2 и TRPV3, но не обладало активностью в отношении TRPA1 [59]. Эхинохром A (**11**, Рисунок 3), нафтохиноидный пигмент морских ежей, ингибировал каналы TRPV3 и Orai1 в низкомикромолярном диапазоне, а также модулировал работу TRPV1 и двупоровых K^+-каналов [60].

1.4.4 Синтетические ингибиторы

Катионный краситель рутениевый красный является неселективным поровым блокатором TRPV и множества других каналов, поэтому иногда используются в качестве антагониста сравнения в исследованиях TRPV3 [15,77]. Местный анестетик, диклонин (**13**, Рисунок 3), мощно и селективно ингибировал токи TRPV3 [61]. Некоторые другие местные анестетики также модулировали активность TRPV3. Лидокаин и его аналоги (**15**, **16**, Рисунок 3) подавляли индуцированные 2-APB токи в TRPV3-экспрессирующих ооцитах *Xenopus laevis* в низко- и субмиллимолярных концентрациях, которые, однако, фармакологически значимы для местной анестезии. Их слабые активирующие свойства также проявлялись в высоких концентрациях. Эффекты, вероятно, не специфичны для других TRP каналов, поскольку в предыдущих исследованиях была показана различная модуляция TRP каналов лидокаином и QX-314 [63]. Антималярийный препарат

гидроксихлорохин (**14**, Рисунок 3) ингибировал TRPV3, однако селективность действия была низкая и наибольшая побочная активность была показана в отношении TRPM8 [62].

Имеются сообщения об успешных попытках дизайна синтетических ингибиторов TRPV3. Два производных сложных эфиров коричного спирта, 7c и 8c (**17**, **18**, Рисунок 3), были получены и описаны как мощные антагонисты TRPV3, которые не проявляли неспецифической активности к TRPV1 и TRPV4 [64]. Синтетическое соединение 26E01 (**21**, Рисунок 3) эффективно блокировало активацию TRPV3 мыши и человека под действием тепла и 2-APB и не оказывало влияния на TRPV1, TRPV2 или TRPV4. Соединение также блокировало эндогенные каналы TRPV3 в клеточной линии кератиноцитов мыши Kera-308, линии эпителиальных клеток толстой кишки DLD-1 и первичных клеток крипт дистального отдела толстой кишки мыши [66]. Имеется сообщение о соединении PC5 (**22**, Рисунок 3), которое является ингибитором TRPV3 со структурой, оптимизированной с помощью компьютерного моделирования. PC5 полностью подавлял токи мышиного TRPV3 в низкомикромолярных концентрациях, но также действовал на TRPV1, TRPC6 и TRPM8, не достигая стопроцентного ингибирования [67]. Также имеется сообщение о соединении 74a, которое эффективно блокирует TRPV3 и обладает оптимизированным фармакокинетическим профилем. Оценка селективности, проведенная на обширном наборе рецепторов и ионных каналов, включая те, которые участвуют в восприятии боли, не показала существенного связывания с побочными мишенями [65]. Синтетическое соединение под названием трпвицин (**23**, Рисунок 3) было создано как еще один мощный и селективный ингибитор TRPV3 [68].

1.4.5 Иные модуляторы TRPV3

Среди модуляторов TRPV3 стоит особенно выделить липидные медиаторы воспаления. В общем случае, медиаторы воспаления способны усиливать функцию TRPV каналов напрямую или опосредованно через клеточные сигнальные каскады. К примеру, TRPV1 напрямую активируется продуктами липоксигеназы, но не простагландинами и ненасыщенными кислотами [78]. При этом, для развития TRPV1-опосредованного воспалительного ответа, помимо действия липидных медиаторов, требуется фосфорилирование канала протеинкиназой C. Таким образом, происходит совместная реализация двух дополняющих друг друга механизмов [79]. TRPV4 активируется анадамидом и арахидоновой кислотой по непрямому механизму, который включает образование метаболитов P450-эпоксигеназного пути [80]. В случае TRPV3

ненасыщенные жирные кислоты, в частности арахидоновая кислота, напрямую усиливают функцию канала, но не активируют его, что было показано на клетках HEK293, ооцитах *Xenopus laevis* и кератиноцитах мышей [81]. Вызванное жирными кислотами усиление функции не блокируется ингибиторами протеинкиназы С, а также не требует метаболизма арахидоновой кислоты, поскольку также наблюдается для ее неметаболизируемых аналогов. Эти результаты свидетельствуют о механизме, регулирующем реакцию TRPV3 на воспаление, который включает прямое действие свободных жирных кислот на канал [81].

1.5 Структурные особенности взаимодействия TRPV3 с лигандами

Ключевой вклад в понимание того, как лиганды TRPV3 взаимодействуют с каналом на структурном уровне, внесла криоэлектронная микроскопия высокого разрешения. Характеристика сайтов связывания и механизмов взаимодействия предоставляет ценные данные для рационального дизайна новых молекул, способных целенаправленно взаимодействовать с TRPV3 (таблица 3).

Первоначальные представления о воротном механизме канала были получены благодаря криоэлектронной структуре комплекса мышиного TRPV3 с 2-APB [5]. В случае мышиного TRPV3, агонист связывается в трех сайтах: верхней области трансмембранного домена S1–S4, основании S1–S4 и сайте, расположенном в линкере домена анкириновых повторов и трансмембранного домена (ARD-TMD). Согласно предложенному механизму, при связывании с верхним сайтом S1–S4 2-APB вытесняет петлю S1–S2 и расширяет верхний пучок S1–S4. Щель между S4 и S6 сужается, вытесняя мембранный фосфолипид из ванилоидного кармана. При этом, интерфейс S1–S4 и порового домена принимает конфигурацию, способствующую открытию канала. Другие два сайта не демонстрируют связи со значительными конформационными изменениями, но, вероятно, необходимы для стабильности порового домена, домена S1-S4 и внутриклеточных доменов во время открытия канала [5]. Для человеческого TRPV3 позже был показан несколько иной механизм. 2-APB связывался только с двумя сайтами: в основании S1-S4 домена и линкера ARD-TMD, стабилизируя канал в открытом или инактивированном состоянии [10].

Молекулярные детерминанты взаимодействия карвакрола с человеческим TRPV3 были получены с помощью молекулярного докинга и сайт-направленного мутагенеза. Уникальный сайт взаимодействия был идентифицирован в линкере S2–S3, причем остаток Leu508 является наиболее важным остатком для взаимодействия [82].

Таблица 3. Сайты связывания экзогенных лигандов TRPV3 по данным криоэлектронной микроскопии.

Лиганд	PDB ID (ортолог) [ссылка]	Взаимодействующие остатки
Верхний S1-S4		
2-APB	6DVZ (mTRPV3) [5]	S1: V458, R462 Петля S1-S2: R464 S2: R487 S3: Y540
Основание S1-S4		
2-APB	6DVY, 6DVZ (mTRPV3) [5]	S1: S444 S2: W493, K500, E501 S3: F526 S4: Y565
Остол	7RAS, 7RAU (mTRPV3) [7]	S1: S444 S2: C496, I497, K500, E501 S4: Y565 TRP: M706
Поровый домен		
Диклонин	7UGG (mTRPV3) [6]	S6: F666
Севофлуран	9UED (hTRPV3) [83]	S6: I662
ARD-TM линкерный домен		
2-APB	6OT5 (hTRPV3) [84]	LH2: H417, L420 Пре-S1: H426, L429 TRP: R693
	6DVY, 6DVZ (mTRPV3) [5]	LH2: H417, L420, T421 Пре-S1: H426, H430 TRP: R693, L694
Остол	7RAS, 7RAU (mTRPV3) [7]	LH2: T421 Пре-S1: H426, H430, W433 TRP: R693, R696
Ванилоидный сайт		
THCV	8V6L, 8V6M (hTRPV3) [10]	S4: L557 S4: N561
Трпвицин	7XJ0 (hTRPV3) [68]	S4: A556, A560 S5: F597, F601 S6: T660
Цитронеллаль, цитраль, линалоол	9JE5, 9JEE, 9JEF (hTRPV3) [85]	S4: A560, L563 S6: L664
Изодигидролавандулаль: (две молекулы)	9JEG (hTRPV3) [85]	

Структурные данные о ингибировании TRPV3 были получены для остола. Криоэлектронная структура комплекса показала, что остол конкурентно вытесняет 2-APB в сайтах связывания агониста у основания S1–S4 и в сайте линкерного домена ARD-TMD, переводя канал в состояние с широко открытой порой и закрытыми внутриклеточными воротами [7]. Как показано с помощью криоэлектронной микроскопии и подтверждено сайт-направленным мутагенезом, местный анестетик диклонин связывается с сайтами на S6 внутри порталов TRPV3, соединяющих мембранную среду с центральной полостью поры. Ингибирование, вероятно, достигается за счет образования механического барьера для ионной проводимости в виде молекул диклонина, выпирающих в направлении поры канала. На примере диклонина было впервые показано связывание низкомолекулярных ингибиторов с порталом поры TRPV3. Ранее было известно, что подобный механизм предположительно осуществляется в случае действия местных анестетиков на потенциал-зависимые натриевые каналы [6]. Криоэлектронная структура человеческого TRPV3 дикого типа в комплексе с трпвицином показала, что ингибитор стабилизирует канал в закрытой конформации, связываясь с остатками в сегментах S4, S5 и S6 в ванилоидном кармане между S1-S4 и поровым доменами. Комплекс с каналом G573S-TRPV3, несущим мутацию, превращающую канал в конститутивно открытый, показал, что трпвицин получает доступ к дополнительным сайтам связывания внутри центральной полости мутантного канала и изменяет его симметрию [68].

Данные криоэлектронной микроскопии для человеческого TRPV3 указывают на конформационное разнообразие канала и существование структурно различных закрытых состояний. В исследовании с использованием двух активаторов канала (2-APB и THCV) было показано, что в их присутствии наблюдается три класса конформаций: несвязанное π-закрытое, агонист-связанное π-открытое и агонист-связанное α-закрытое [10]. Хотя два активатора связываются в разных участках канала (Таблица 3), структуры открытого состояния (открытое 2-APB-связанное и открытое THCV-связанное) выявили одинаковую проводящую конформацию. Аналогично, агонист-связанные инактивированные состояния также продемонстрировали высокую степень сходства. Таким образом, аллостерические агонисты TRPV3 способны открывать и инактивировать канал схожим образом. Так, была предложена общая модель трех состояний TRPV3, которая включает закрытое (π), открытое (π) и инактивированное (α) состояния. В целом, известно, что π-уширение α-спирали дестабилизирует структуру и поэтому, как правило, имеет функциональное значение. При сравнении закрытого и инактивированного состояний было показано, что все конформационные изменения локализованы в трансмембранной области:

порообразующие спирали S6 претерпевают переход из π- в α-конфигурацию, что сопровождается поворотом С-концевой части S6 примерно на 100º. Это выводит в просвет поры совершенно другой набор остатков и делает невозможным прохождение ионов и воды. Таким образом, π-уширение в S6 действует как молекулярный шарнир, регулирующий функцию канала [10].

1.6 Функции TRPV3 в нормальных и патологических процессах

1.6.1 Хемо- и термочувствительность

TRPV3 обильно представлен в кератиноцитах кожи, в особенности возле волосяных фолликул и в базальном слое эпидермиса у млекопитающих [86–89]. В направлении внешних слоев эпидермиса экспрессия TRPV3 уменьшается [30]. TRPV3 также экспрессируется в сенсорных нейронах человека, спинномозговых двигательных нейронах и периферических нервах [1,2,90], но до сих пор неясно, экспрессируется ли TRPV3 в сенсорных нейронах крыс и мышей [3,39]. Кроме того, экспрессия TRPV3 была обнаружена в желудочно-кишечном тракте, в т.ч. эпителии полости рта, языка, гортани, дистальных отделов толстой кишки, тощей кишки и подвздошной кишки [46,86,91–93].

Роль TRPV3 в термочувствительности изучалась с помощью нокаутных мышей. В первом подобном исследовании было показано, что мыши TRPV3$^{-/-}$ имели значительно сниженную температурную чувствительность для безвредных и вредных температур по сравнению с однопометными мышами дикого типа, но нормальную реакцию в условиях термической и механической гиперальгезии [94]. Позже стало известно, что вклад TRPV3 в восприятие температуры у мышей зависит от генетического фона (инбредной линии), использованной для нокаута. В частности, нокауты из линии C57BL6 не демонстрировали изменений в тепловых предпочтениях животных в сравнении с животными дикого типа. При этом, мыши линии 129S6 после нокаута TRPV3 выбирали более узкий диапазон температур, предпочитая прохладный пол в экспериментальной установке. Также, нокауты обеих линий не показывали отличий от дикого типа в тепловой ноцицепции или тепловой гиперальгезии [95]. Кроме того, было показано, что вклад TRPV3 в значительной степени зависит от взаимодействия с TRPV1-зависимыми и другими механизмами терморегуляции [96].

Чувствительные нейроны функционируют в микросреде, которая определяется сложными взаимодействиями нейронов с ненейрональными клетками: иммунными клетками, вспомогательными нейрональными клетками, фибробластами, адипоцитами и

кератиноцитами [97]. В случае TRPV3, передача сенсорных (в том числе болевых) сигналов от кератиноцитов к чувствительным нервным окончаниям, по-видимому, осуществляется с помощью химических посредников. Предполагается, что TRPV3 у людей и мышей участвует в восприятии тепла окружающей среды (температуры выше 31-33 °C) эпидермальными кератиноцитами путем передачи сигналов по АТФ-зависимому пути к свободным нервным окончаниям чувствительных нейронов [1–3,94,98,99]. Активация TRPV3 при повышении температуры приводит к повышению уровня внутриклеточного Ca^{2+} в кератиноцитах. Это вызывает высвобождение АТФ, которое, в свою очередь, активирует пуринэргические рецепторы на концах нейронов спинномозговых ганглиев [98–100].

В ранних исследованиях агонистов TRPV3 особое внимание уделялось веществам-сенсибилизаторам кожного покрова – агентам, которые модулируют чувствительность кожи к теплу. Например, камфора активировала мышиные кератиноциты из первичной культуры, но не сенсорные нейроны, и эта активность не наблюдалась у *trpv3*$^{-/-}$ мышей [94]. Компоненты эфирных масел растительного происхождения, такие как тимол, карвакрол и эвгенол, также активировали каналы TRPV3 эпителия полости рта и носа, где те могут действовать как рецепторы химического чувства (хеместезиса), наряду с TRPV1, TRPA1, TRPM5 и TRPM8, модулируя или инициируя сигналы нервной системы [30]. Было показано, что соединения, вызывающие ощущения тепла или холода, оказывают разнообразное действие на термо-TRP-каналы. Ментол, который известен своим охлаждающим эффектом за счет действия на чувствительный к холоду TRPM8, также активирует TRPV3 в миллимолярных концентрациях [40] и TRPA1 в низкомикромолярных концентрациях с последующей обратимой блокадой при увеличении концентрации [101]. Кроме того, камфора активировала TRPV1 (лучше, чем TRPV3), но ингибировала TRPA1, а коричный альдегид (циннамальдегид) активировал TRPV3 и TRPA1, но ингибировал TRPM8 [40]. Цитраль, компонент лемонграсса, демонстрировал сложную модуляцию сенсорных TRP-каналов (TRPV1-V4, TRPA1, TRPM8). В случае TRPV3, цитраль вызывал активацию с последующей быстрой десенситизацией [39].

1.6.2 Боль

Физиологический вклад TRPV3 в болевые сигналы до сих пор до конца неясен. TRPV3 экспрессируется в сенсорных нейронах спинномозговых ганглиев и в ганглиях тройничного нерва у людей и приматов [2]. Во многих тканях человека TRPV1, имеющий

функциональное значение при невропатических болевых состояниях, и TRPV3 ко-экспрессируются [102]. TRPV3 экспрессируется вместе с TRPV1 в дискретной субпопуляции вагусных афферентных нейронов и может вносить вклад в передачу сигналов в том же качестве, что и TRPV1 [103] (роль TRPV3 в нодозных ганглиях в качестве регулятора парасимпатического отдела нервной системы была позже показана в другой работе, о которой будет упомянуто в следующем разделе). Наряду с TRPV1, экспрессия TRPV3 повышается в периферических нервах после повреждения, но экспрессия обоих каналов заметно снижается в коже при диабетической невропатии [90]. На генетическом уровне потенциально патогенные варианты TRPV3 были идентифицированы у пациентов с нейропатией тонких волокон [104], мигренью [105] и эритромелалгией [106]. Сенсорная гипоиннервация эпидермиса и, как следствие, дефицит ощущений острой механической боли, холода и зуда наблюдаются при мутациях с усилением функции TRPV3, например, G573S [107]. В поведенческой модели боли мыши с мутантным гиперактивным каналом TRPV3 (G573S) показали повышенный механический порог для механической боли и сниженную реакцию на острую боль по сравнению с контрольными группами [108].

Под действием агонистов TRPV3 (эвгенол, 2-APB) или тепловой стимуляции кератиноциты секретируют провоспалительные медиаторы (IL-1α, PGE2, TGF-α, АТФ) [99,109]. АТФ, высвобождаемый кератиноцитами, способен взаимодействовать с пуринергическими рецепторами сенсорных нейронов, вызывая боль и нейрогенное воспаление [110–112]. Интересно, что несколько провоспалительных агентов (брадикинин, PGE2, гистамин, АТФ) могут повышать чувствительность TRPV3 к высоким температурам, приводя к автокаталитическому TRPV3-опосредованному усилению воспаления кожи и связанных с ним симптомов, таких как термическая гипералгезия [14,113,114].

В другом исследовании утверждается, что для болевых ощущений критически важна функция TRPV3 в центральной нервной системе. Синтетические антагонисты TRPV3 снижали реакцию нейронов широкого динамического диапазона (WDR-нейроны) в ответ на слабое механическое раздражение у крыс с аллодинией. Этот эффект был опосредован периферическими рецепторами кожи и телами DRG нейронов. Однако повышенная спонтанная активность WDR-нейронов снижалась только под действием антагонистов, проникающих через гематоэнцефалический барьер, или при их введении в желудочки мозга, а интраспинальное введение не имело эффекта. Таким образом, показано, что для антагонистов TRPV3 существует два локуса действия:

супраспинальный, отвечающий за спонтанную боль, и периферический, отвечающий за вызванную боль. При этом, супраспинальный компонент локализуется в ростральной вентромедиальной области продолговатого мозга [115].

Агонист TRPV3 фарнезилпирофосфат (FPP) снижал тепловой порог активации TRPV3, приводя к повышенной чувствительности к теплу у мышей. Введение FPP также вызывало боль у мышей с воспалением, получавших каррагинан, и эффекты были устранены предварительной обработкой рутениевым красным или нокдауном TRPV3. Примечательно, что FPP индуцировал ноцифенсивное поведение только в условиях воспаления [41]. Ингибитор изопентенилпирофосфат (IPP) подавлял острую ноцицепцию, индуцированную коричным альдегидом, и TRPV3-опосредованную FPP-индуцированную боль в воспаленной лапе. Кроме того, IPP уменьшал тепловую и механическую гипералгезию и механическую аллодинию, индуцированные полным адъювантом Фрейнда, но у мышей с нокаутом по TRPV3 была уменьшена только вызванная IPP тепловая гиперанальгезия [47]. Введение ингибитора 17(R)-резолвина D1 уменьшало боль, вызванную FPP, и отменяло термическую, но не механическую гиперчувствительность, вызванную воспалительной реакцией, при этом, эффект был ослаблен у мышей с локальным нокдауном TRPV3 [50].

Ингибитор TRPV3 цитрусинин II был изучен в ряде мышиных болевых моделей, в которых он проявил слабую обезболивающую активность [54]. Мощный и селективный антагонист TRPV3 74a от AbbVie Inc. продемонстрировал благоприятные доклинические эффекты в двух различных моделях невропатической боли, показывая преимущества в сравнении габапентином, и вызывал антиноцицепцию в резерпиновой модели центральной боли, но активные дозы (30-100 мг/кг) были слишком высоки для дальнейшего продвижения препарата [65].

На данный момент, практически неизвестны примеры, когда ингибиторы TRPV3 изучались в клинических испытаниях [116–118]. Один из известных примеров – соединение GRC15300 (Sanofi-Aventis/Glenmark), исследуемое для пациентов с периферической нейропатией, разработка которого завершилась на второй фазе [118].

Противоболевые эффекты ингибиторов TRPV3 представлены в таблице 4.

Таблица 4. Противоболевые эффекты ингибиторов TRPV3. Сокращения: i.p. – интраперитонеально, i.d. – интрадермально, p.o. – перорально.

Экспериментальная модель	Тестируемое вещество	Активная доза/концентрация, способ введения	Ссылка
формалин-индуцированная боль	цитрусинин-II	2,9; 14,3 мг/кг; внутрибрюшинно	[54]
уксуснокислые корчи	цитрусинин-II	2,9; 14,3 мг/кг; внутрибрюшинно	[54]
тест горячей пластины	цитрусинин-II	2,9; 14,3 мг/кг; внутрибрюшинно	[54]
тест на отдергивание хвоста	цитрусинин-II	1,5; 2,9; 14,3 мг/кг; внутрибрюшинно	[54]
CFA-индуцированное воспаление, порог тепловой боли	17(R)-резолвин D1	30 мкМ в 20 мкл; интраплантарно	[50]
	изопентенил пирофосфат	1 мМ; внутрикожно	[47]
CFA-индуцированное воспаление, FPP-индуцированная боль	17(R)-резолвин D1	30 мкМ в 20 мкл; интраплантарно	[50]
каррагинан-индуцированное воспаление, FPP-индуцированная боль	изопентенил пирофосфат	1 мМ; внутрикожно	[47]
хроническая травма при сдавливании	74a	30; 100 мг/кг; перорально	[65]
перевязка седалищного нерва	74a	30; 100 мг/кг; перорально.	[65]
резерпин-индуцированная центральная боль	74a	10; 30; 100 мг/кг; перорально	[65]

1.6.3 Другие функции в нервной системе

TRPV3 на уровне белка не был обнаружен в мозге мыши, однако был обнаружен низкий уровень мРНК [119,120]. Также, мРНК TRPV3 экспрессируется в мозжечке и гипоталамусе крыс [121,122] и головном мозге человека [1]. На данный момент, функции TRPV3 в головном мозге изучены недостаточно. Имеется сообщение о том, что TRPV3 вносит вклад в синаптическую пластичность в гиппокампе. Препараты, полученные от мышей с нокаутом TRPV3, наряду с нокаутами TRPV1, но не TRPV4, не проявляли долговременной депрессии возбуждающих синапсов на интернейронах CA1 гиппокампа и

демонстрировали сниженное долговременное потенцирование в синапсах пирамидальных нейронов CA3-CA1 [123].

Инсенсол ацетат, агонист TRPV3, был использован в качестве фармакологического инструмента для выявления некоторых психоактивных функций TRPV3 [43]. Внутрибрюшинная инъекция вещества мышам вызывала множественное влияние на эмоции и поведение, которое сопровождались изменениями в активации c-Fos в нескольких областях головного мозга. Связь активации TRPV3 с анксиолитическими и антидепрессант-подобными эффектами соединения была подтверждена на мышах, нокаутным по TRPV3, у которых эффекты не наблюдались [43]. Эти данные являются ценным свидетельством важности роли TRPV3 в нервной системе. Дополнительно, противовоспалительный и защитный потенциал инсенсол ацетата был продемонстрирован у мышей с ишемическим повреждением головного мозга. Эффекты были связаны с ингибированием NF-κB и были частично ослаблены у мышей с дефицитом TRPV3 [124]. Имеется сообщение о том, что повышенная экспрессия TRPV3 усиливает нервную возбудимость и усугубляет повреждение мозга при ишемии. Ингибирование TRPV3 форситозидом B снижало нервную возбудимость и ослабляло внутримозговое повреждение у мышей. Таким образом, блокирование гиперактивного TRPV3 может рассматриваться в качестве терапии, способствующей восстановлению после ишемического инсульта головного мозга [125].

TRPV3 представлен в нодозных ганглиях блуждающего нерва, где предложена его роль в качестве регулятора парасимпатической нервной системы. Нодозный ганглий собирает информацию от внутренних органов, передавая сигналы в мозг для регуляции висцеральных функций. Ароматическое масло лемонграсса и ингаляционный анестетик севофлуран активируют TRPV3 и подавляют учащение пульса и дыхания у мышей в стрессовых условиях. Согласно предлагаемому механизму, активация TRPV3 в нодозных ганглиях стимулирует глутаматэргическую передачу в ядро одиночного тракта (cNTS) в мозге, повышая тонус блуждающего нерва. Успокаивающий эффект устранялся при ваготомии блуждающего нерва или нокауте TRPV3 [83].

1.6.4 Зуд, дерматит и кожное воспаление

В свете последних исследований становится очевидной важная роль TRPV3 в качестве посредника нейроммунных реакций в коже [109,126]. У животных с мутацией, усиливающей функцию TRPV3, наблюдаются алопеция, спонтанный дерматит и чрезмерное расчесывание, что указывает на роль TRPV3 в генерации зуда [87,127].

Животные с генетическим нокаутом по TRPV3 демонстрируют значительное снижение интенсивности зуда, вызванного гистамином [51]. Экспрессия TRPV3 повышена в биоптатах кожи пациентов с послеожоговыми зудящими рубцами [128].

Родственные каналы TRPV1 и TRPA1 также являются важными участниками болевых и воспалительных каскадов [129,130], но в последние годы также стала очевидной их связь с зудом [131]. Эти каналы могут функционировать под контролем рецепторов, связанных с G-белком, которые активируются пруритогенными веществами, под регуляцией цитокиновых или толл-подобных рецепторов. Также, TRPA1 способен непосредственно воспринимать электрофильные раздражители. Экспрессия TRPV1 и TRPA1 повышается при воспалительных и аллергических состояниях кожи. У животных с нокаутом по TRPV1 наблюдается сниженная реакция на вызванный гистамином зуд, а чувствительные к гистамину DRG-нейроны малого диаметра отвечают на капсаицин, агонист TRPV1 [132,133]. Таким образом, в отдельных случаях, вклад TRPV3, TRPV1 и TRPA1 может дополнять друг друга.

Повышенная экспрессия TRPV3 обнаруживается в воспаленных участках кожи, например, при акне. Активация TRPV3 промотировала секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов в человеческих себоцитах, а также инфильтрацию нейтрофилов к сальным железам через сигнальный путь TLR2-NF-κB. При этом, генетический нокаут и фармакологическая блокада TRPV3 трпвицином уменьшала воспалительные проявления [134].

Показано, что в сигнальном каскаде зуда TRPV3 может находиться под контролем активируемого протеазой рецептора 2 (PAR2). В кератиноцитах, в которых отсутствовал TRPV3, нарушалась функция PAR2, что приводило к снижению активации нейронов и уменьшенному числу расчесываний в ответ на агонисты PAR2. Кроме того, была показана связь между TRPV3 и рецептором PAR2 в биоптатах кожи пациентов и мышей с атопическим дерматитом, а их ингибирование ослабляло зуд и воспалительные реакции в мышиных моделях [112].

Исследовался вклад TRPV3 в псориатический зуд головы. В биоптатах кожи головы 27 пациентов с псориазом был проведен иммуногистохимический анализ известных нейроиммунных медиаторов зуда. Пациенты были разделены на группы в зависимости от степени выраженности зуда: с легким/умеренно выраженным или тяжелым. Экспрессия PAR2, субстанции P, TRPV3, TRPM8 и интерлейкина-23 значительно коррелировала с интенсивностью зуда. При этом, не была обнаружена

корреляция с гистамин-положительными клетками, что указывает на негистаминергический характер патологического процесса [135].

В современном масштабном исследовании был показан TRPV3-опосредованный механизм того, как местное повреждение кожи (инфекция или ультрафиолет) запускает системный гуморальный ответ. Когда инфекция или ульрафиолет повреждают кератиноциты, в них запускается накопление избытка фарнезилпирофосфата (FPP), активатора TRPV3. Активация канала вызывает кальциевый ток и каскад реакций, приводящий к выделению цитокинов IL-6 и CCL20. Эти цитокины привлекают дендритные клетки и стимулируют Т-фолликулярные хелперы, которые мигрируют в лимфоузлы и запускают размножение В-клеток в герминативных центрах. Этот механизм нарушен у больных системной красной волчанкой, у которых повреждение и инфецирование кожи вызывает аутоимунную реакцию и обострения. Таким образом, было показано, что FPP действует как эндогенный алармин – внутренний сигнал тревоги, вырабатывающийся при клеточном повреждении и напрямую связанный функционально с TRPV3. Ось FPP-TRPV3 может служить мишенью фармакологического воздействия для подавления избыточного имунного ответа, в том числе при системной красной волчанке [136]. В еще одном исследовании также проводилась причинно-следственная связь между воздействием ультрафиолета и гиперактивацией TRPV3. Повреждение кожи ультрафиолетом типа В усиливала экспрессию TRPV3, IL-6 и TNF-α, а фармакологическая блокада остолом или вербаскозидом или генетический нокаут канала уменьшали воспалительные проявления [137].

Активатор канала карвакрол оказывал немонотонное воздействие на культуру иммортализованных кератиноцитов человека HaCaT, стимулируя пролиферацию в концентрациях до 100 мкМ, но снижая жизнеспособность клеток при 300 мкМ. Пролиферационный эффект не наблюдался при подавлением экспрессии TRPV3, и, вероятно, зависит от TRPV3-опосредованного входа Ca^{2+} в цитоплазму [138]. Внутрикожная инъекция карвакрола мышам вызывала зуд, который был опосредован TRPV3 и TRPA1. Карвакрол активирует оба канала с одинаковой активностью, но за активацией TRPA1 следует быстрая десенситизация. Временной характер расчесываний у животных был двухфазным. Начальная фаза предположительно представляла собой совместный вклад TRPA1 и TRPV3, а следующая устойчивая фаза была в основном опосредована TRPV3, что было продемонстрировано на мышах с нокаутом по TRPV3, у которых эта фаза была снижена примерно на 90% [139]. Животная модель на основе карвакрола используется для оценки противозудных эффектов ингибиторов TRPV3.

Имеется сообщение о том, что среди медицинских препаратов, диклонин, местный анестетик для облегчения боли и зуда слизистых оболочек и кожи, является эффективным ингибитором TRPV3. Диклонин значительно подавлял TRPV3-опосредованный зуд, индуцированный карвакролом, по сравнению с контрольной группой с нокаутом по гену *trpv3* [61].

Ингибиторы TRPV3 из лекарственных растений проявляют положительные эффекты в мышиных моделях зуда, дерматита и воспаления кожи, что делает их перспективными кандидатами для экспериментальной терапии кожных заболеваний. Форситозид B эффективно снижал цитотоксичность карвакрола in vitro, подавлял острый зуд, вызванный пруритогенами (карвакролом или гистамином), и уменьшал число эпизодов расчесываний в модели сухой кожи, спровоцированной продолжительным нанесением смеси ацетона-эфира-воды [52]. Близкое по структуре соединение вербаскозид облегчало вызванный карвакролом зуд и воспаление кожи [53]. Остол значительно ослаблял зуд у мышей, вызванный либо ацетоном-эфиром-водой, либо гистамином, но не у мышей с дефицитом TRPV3 [51]. Аналогичным образом, цитрусинин-II ослаблял зуд у мышей, вызванный ацетоном-эфиром-водой или гистамином, но не хлорохином [54]. Изохлорогеновые кислоты A и B оценивали in vivo на модели зуда, вызванного хроническим применением карвакрола. Трансдермальное нанесение соединений уменьшало отек и расчесывание ушей [55]. Введение скутеллареина мышам подавляло аллергический дерматит, индуцированный 2,4-динитрофторбензолом, и зуд, индуцированный карвакролом, и облегчало эпидермальную гиперплазию и воспалительную реакцию кожи и не вызвало положительных эффектов у мышей с нокаутом TRPV3 в модели с использованием карвакрола. Скутеллареин также подавлял индуцированную карвакролом пролиферацию кератиноцитов HaCaT in vitro, экспрессию и высвобождение хемотаксических факторов и хемотаксис мононуклеарных клеток периферической крови [57]. Синтетическое соединение трпвицин, которое эффективно ингибировало токи TRPV3 in vitro, ослабляло зуд у мышей, получавших агонист PAR2 SLIGRL-NH_2 при внутрикожной инъекции. Системное введение трпвицина в высоких дозах (100 мг/кг) также подавляло приступы почесывания и отек ушей у мышей, получавших кальципотриол [68].

Противозудные эффекты ингибиторов TRPV3 приведены в таблице 5.

Таблица 5. Противозудные эффекты ингибиторов TRPV3.

Экспериментальная модель	Исследуемое соединение	Активная доза/концентрация; способ введения	Ссылка
зуд, вызванный гистамином	форситозид B	0,3; 3; 30 мкМ; внутрикожно	[52]
	остол	300 нМ; внутрикожно	[51]
	цитрусинин-II	10 мкМ; внутрикожно	[54]
зуд, вызванный карвакролом	форситозид B	30; 300 мкМ; внутрикожно	[52]
	вербаскозид	300 мкМ внутрикожно	[53]
	изохлорогеновая кислота A	1 мМ; наружно	[55]
	изохлорогеновая кислота B	1 мМ; наружно	[55]
	скутеллареин	0,2; 0,5 мг/кг/день; подкожно	[57]
	диклонин	10; 50 мкМ; внутрикожно	[61]
зуд сухой кожи, вызванный смесью ацетон-эфир-вода	форситозид B	3; 30 мкМ внутрикожно	[52]
	остол	30; 300 нМ; внутрикожно	[51]
	цитрусинин-II	5; 10 мкМ; внутрикожно	[54]
дерматит и зуд, вызванные DNFB	скутеллареин	0,2; 0,5 мг/кг/день; подкожно	[57]
зуд, вызванный SLIGRL-NH_2	трпвицин	10; 100 мкМ; внутрикожно	[68]
зуд, вызванный кальципотриолом	трпвицин	100 мг/кг/день; перорально	[68]

1.6.5 Синдром Олмстеда

Установлена достоверная связь между TRPV3 и редким наследственным заболеванием под названием синдром Олмстеда. В настоящее время известны три гена, мутации в которых приводят к развитию заболевания: рецессивная Х-сцепленная мутация *mbtps2* [140,141], аутосомно-доминантная мутация *perp* [142,143] и аутосомно-доминантная или рецессивная мутация *trpv3* [144,145]. Классическими проявлениями синдрома Олмстеда являются двусторонняя ладонно-подошвенная кератодермия и кератотические бляшки вокруг рта, носа, глаз, наружного слухового прохода, пупка и аногенитальной области. Заболевание сопровождается болью, зудом и жжением в области гиперкератотических очагов, патологией волос и ногтей, поражениями роговицы, лейкокератозом и повышенной склонностью к рецидивирующим инфекциям [146].

TRPV3-опосредованный синдром Олмстеда связан с более чем 20 аминокислотными заменами, которые приводят к усилению функции канала (Рисунок 4).

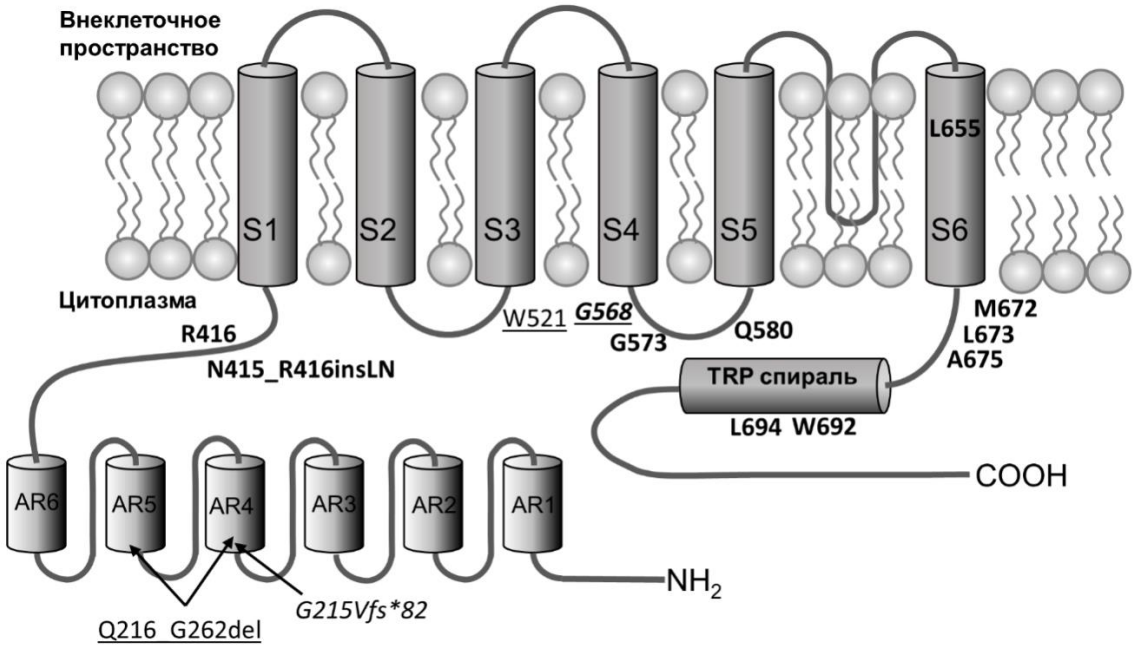


Рисунок 4. Схематическое расположение мутаций, выявленных при синдроме Олмстеда. Доминантные мутации выделены жирным шрифтом, рецессивные мутации подчеркнуты, а полудоминантные мутации выделены курсивом [144,146–148].

Замены в G573, G568 и L673 являются наиболее распространенными, но мутации могут также происходить в W692, W521, Q580, M672 и некоторых других положениях. Большинство мутаций локализовано в линкере S4-S5 или С-концевой части белка [145,146]. Экспрессия мутантов, ассоциированных с синдромом (G573S, G573C, G573A и W692G), вызывает нарушение везикулярного транспорта, что приводит к уменьшению поверхностной локализации мутантных каналов, а также тесно связанного с ними канала TRPV1. Экспрессия мутантов также вызывает снижение клеточной адгезии, изменение распределения эндоплазматического ретикулума и телец Гольджи и уменьшению количества лизосом [149]. TRPV3 с заменами G568C и G568D также коррелировал с уменьшением размера клеток и значительными дефектами в количестве лизосом и их распределении. Мутантные каналы нарушали поддержание нормального pH в лизосомах, скорее всего, действуя как каналы утечки [144]. Мутации, усиливающие функцию TRPV3, также являются причиной развития патологий кожи и волосяного покрова у мышей. В частности, у линии DS-Nh, несущей мутацию G573S, в нормальных условиях развивается дерматит и алопеция, а также наблюдается инфильтрация тучных клеток в пораженные участки кожи [87]. Похожий фенотип наблюдался у трансгенных мышей C57BL-Nh с

геном TRPV3-G573S [127]. В гетерологичных системах показано, что замены G573S и G573C приводят к конститутивно открытому состоянию канала, что, вероятно, нарушает гомеостаз клеточного кальция [150].

Было показано, что вариант с усилением функции или фармакологическая активация TRPV3 приводит к активации сигнального пути PARP1/AIFM1/MIF, что приводит к партанатосу, особой форме гибели клеток. Хелатирование кальция, удаление активных форм кислорода или ингибирование синтазы монооксида азота эффективно останавливали партанатос, что указывает на то, что TRPV3 участвует в регуляции этого процесса через окислительный стресс, опосредованный кальцием [151].

Имеются данные о том, что патогенез синдрома Олмстеда связан с сигнальным путем TRPV3/EGFR. Лечение пациентов, несущих мутацию с усилением функции G573C, ингибитором EGFR эрлотинибом привело к быстрому и эффективному облегчению симптомов ладонно-подошвенной кератодермии, боли и зуда. Наблюдалось повышенное фосфорилирование EGFR в коже пациентов с синдромом, что встраивается в концепцию, согласно которой активация TRPV3 стимулирует передачу сигналов EGFR через активацию пути mTOR [152].

Современные методы лечения синдрома Олмстеда включают системные ретиноиды, кортикостероиды, и другие противовоспалительные и обезболивающие препараты, которые, однако, обеспечивают лишь временное облегчение симптомов [146]. Использование антагонистов TRPV3 может представлять собой новую таргетную стратегию в этом направлении. Местный анестетик диклонин был протестирован против TRPV3 с мутациями усиления функции G573S и G573C in vitro и показал эффективное ингибирование токов утечки и уменьшение гибели клеток, вызванных сверхактивными мутантами [61]. Форситозид B также дозозависимо уменьшал гибель HEK293 или HaCaT, гетерологично экспрессирующих конститутивно открытый мутант TRPV3-G573S [52]. Трпвицин ингибировал токи hTRPV3-G568V и mTRPV3-G568V, гетерологично экспрессируемые в клетках HEK293T. Трпвицин также был протестирован на гетерозиготных мышах *trpv3*$^{+/G568V}$, у которых наблюдались симптомы, сходные с симптомами пациентов с синдромом Олмстеда, в частности выпадение волос. Мыши, которым местно наносили на спину крем, содержащий 1% трпвицина, показали значительно более длинные стержни волос и меньшее выпадение волос в течение всего периода лечения [68].

1.6.6 Заживление ран и барьерные функции кожи

Известно, что TRPV3 участвует в барьерных функциях кожи и процессах, связанных с заживлением ран. Заживление ран у мышей с нокаутом по *trpv3* происходило значительно медленнее, чем у дикого типа [153]. Активация TRPV3 фарнезилпирофосфатом улучшала заживление кожных ран и приводила к более эффективному сопротивлению бактериальной инфекции. Эндогенная экспрессия белка TRPV3 была обнаружена в макрофагах, где он присутствовал в лизосомах и ядрышке. В условиях гипертермического шока присутствие TRPV3 в ядрышке коррелировало с функцией лизосом и уровнем стресса [154]. Согласно другим данным, экспрессия мРНК TRPV3 практически не обнаруживалась в нестимулированных или стимулированных липополисахаридом мышиных макрофагах [155]. Другие данные указывают на то, что TRPV3 регулирует синтез оксида азота в коже, способствуя таким образом заживлению ран [156]. Синтетический активатор KS0365 ускорял миграцию кератиноцитов, которая сопровождалась значительными опосредованными TRPV3 кальциевыми ответами в мигрирующих в переднем фронте клетках, что может указывать на вклад TRPV3 в реэпителизацию при ране кожи [37].

Положительные эффекты в виде усиленной регенерации кожи и повышенной пролиферации кератиноцитов наблюдались при местном нанесении растительных эфирных масел мышам. Существенным компонентом исследованых масел являются ациклические монотерпены, среди которых для цитронеллаля, цитраля, линалоола и изодигидролавандулаля было показано прямое связывание с TRPV3 [85].

1.6.7 Формирование волосяного покрова

TRPV3 обильно представлен в эпителии волосяных фолликул человека во время фаз анагена и катагена и в кератиноцитах наружной оболочки корня, но не в фибробластах дермального сосочка и дермальных фибробластах кожи [157,158]. Показано, что TRPV3 необходим для нормального роста и развития волос. Генетический нокаут TRPV3 у мышей вызывает волнистую шерсть и вьющиеся вибриссы [94]. Напротив, мутации с усилением функции TRPV3 приводят к выпадению волос из-за нарушения регенерации волосяных фолликулов вследствие стимуляции поздней дифференцировки кератиноцитов и апоптоза. Сообщается, что мутации TRPV3 с усилением функции подавляют регуляторы транскрипции FOXN1, MSX2, DLX3 и GATA3, которые имеют решающее значение для дифференцировки фолликулярных кератиноцитов [157,159–162]. Сигнальная ось TGF-

α/EGFR, которая имеет ключевое значение для развития волосяного фолликула и стержня волоса, также была связана с функционированием TRPV3 [163,164]. Активация EGFR в кератиноцитах сопровождается активацией каналов TRPV3, что стимулирует высвобождение TGF-α [163]. Мыши с нокаутом по TRPV3 имеют фенотипы, которые очень похожи на фенотипы мышей с потерей функции TGF-α и мутациями генов EGFR [94,99].

Предполагается участие TRPV3 в формировании волосяного покрова у других млекопитающих, в частности, у альпак. Существует две породы альпак: уакайя, имеющая компактную, мягкую, сильно извитую шерсть, похожую на плюш, и сури, имеющая более длинную, прямую и гладкую шерсть. Анализ генома сури показал, что их ген *trpv3* содержит ранний стоп-кодон и не кодирует полноразмерный функциональный белок, что может вносить вклад в специфический морфогенез волос этой породы [165].

Имеется сообщение о посредничестве TRPV3 в развитии андрогенетической алопеции. Генетический нокаут или блокада канала форситозидом А ускоряли восстановление волосяного покрова у мышей с алопецией, вызванной введением дигидротестостерона [166].

Химическая активация TRPV3 эвгенолом, карвакролом и 2-APB дозозависимо ингибирует удлинение стержня человеческого волоса и пролиферацию кератиноцитов, а также индуцирует фазу катагена цикла волосяных фолликулов и апоптоз кератиноцитов [88,158]. Ингибирование TRPV3 форситозидом B или короткими шпилечными РНК предотвращало гибель клеток наружной оболочки корня человека, индуцированную активацией карвакролом. Форситозид B также в значительной степени уменьшал ингибирование роста волос, вызванное карвакролом [88].

1.7 Резюме

Таким образом, существующий массив литературы однозначно указывает на важность исследования канала TRPV3. Несмотря на это, молекулярные особенности его функционирования и роль в организме до сих пор изучены недостаточно.

По гомологии и структуре TRPV3 объединяется с ванилоидными TRP-каналами (TRPV), функционально – с разнородными с термо-TRP каналами, но, при этом, демонстрирует уникальный биофизический и фармакологический профиль.

Химические модуляторы канала представляют собой структурно разнообразные соединения с различными профилями действия и потенциалом применения. Важное место

среди них занимают лиганды растительного происхождения, что подтверждает перспективность поиска новых лигандов TRPV3 именно в растительных экстрактах.

На сегодняшний момент, наиболее представлены исследования, посвященные роли TRPV3 в эпидермисе, однако его функции в других тканях постоянно дополняются новыми данными. По всей видимости, канал выполняет роль «мостика» между сенсорной и иммунной функциями организма. Модуляторы канала играют важную роль в фундаментальных физиологических работах, посвященных TRPV3, хотя селективность основных применяемых агентов до сих пор недостаточна. Кроме того, модуляторы канала показывают высокий потенциал в животных моделях и, следовательно, могут быть использованы для валидации TRPV3 как терапевтической мишени и последующей разработки в качестве лекарственных препаратов.

2. Материалы и методы

2.1 Материалы

2.1.1 Реактивы и расходные материалы

Деионизированная вода с сопротивлением 18,2 МОм, очищенная с помощью установки Milli-Q system (Millipore, США). Этанол (Химмед, Россия), ацетонитрил (Криохром, Россия), трифторуксусная кислота (Sigma, США), диметилсульфоксид (Sigma), *d*6-диметилсульфоксид (Sigma).

Гидроксид натрия (Химмед), глюкоза (Sigma), хлорид натрия (Химмед, Россия), хлорид калия (Химмед), хлорид магния (Химмед), хлорид кальция (Химмед), хлорид цезия (Sigma), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES, Химмед), 1,2-бис(о-аминофенокси)этан-N,N,N′,N′-тетрауксусная кислота (BAPTA, Sigma), 2-(N-морфолино)-этансульфоновая кислота (MES, Химмед), гентамицин (Sigma), тетрациклин (Sigma), бластицидин (Sigma), зеоцин (Sigma), пенициллин-стрептомицин (PanEco, Россия), капсаицин (Sigma), 2-амиэтоксидифенил борат (Sigma), карвакрол (Sigma), GSK1016790A (Sigma), аллилизотиоцианат (АИТЦ) (Sigma), гистамина дигидрохлорид (Sigma), лоратадин (Teva Pharmaceutical Works Private Co, Венгрия, серийный номер 0810523), 14-дезокси-11,12-дидегидроандрографолид (InterBioScreen Ltd., Россия, каталожный номер BB_NC-03280), иономицин (Sigma), каннабидиол (Sigma).

Колонка для твердофазной экстракции Chromabond C18ec/5000 мг (Macherey-Nagel, Германия), 96-луночный планшет черный с прозрачным дном (ПанЭко), 96-луночный прозрачный планшет (ПанЭко), боросиликатное стекло с филаментом (Sutter Instrument, Германия), инсулиновые шприцы на 0,3 мл с иглами 30G BD Micro Fine Plus Demi U100 (Becton Dickinson, США).

Эндонуклеазы рестрикции DpnI FastDigest (ThermoFisher), PvuI (ThermoFisher), PfuSE (СибЭнзим, Россия).

2.1.2 Наборы реактивов

T-Rex System (Invitrogen, США), Cell Counting Kit – 8 (Sigma), Fluo-4 direct calcium assay kit (ThermoFisher), липофектамин 2000 (ThermoFisher).

2.1.3 Оборудование

Вакуумный концентратор CentriVap Concentrator с системой охлаждения CentriVap Cold Trap −84°C (Labconco, США),

лиофильная сушка FreeZone 2.5 (Labconco, США) с масляным вакуумным насосом W series 5 8912A (Welch, США),

лабораторный pH-метр pH-420 (Аквилон, Россия),

ВЭЖХ насос Waters 1525 Binary HPLC Pump (США),

детектор УФ/видимого диапазона Waters 2489 (США),

колонка для ВЭЖХ Jupiter C5, 250 x 10 мм (Phenomenex, США),

колонка Luna PFP(2), 250 x 10 мм (Phenomenex, США),

система хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения: модуль разделения Ultimate 3000 RSLCnano и масс-спектрометр с ионизацией электроспреем Orbitrap Fusion Lumos (ThermoFisher Scientific, США),

ЯМР-спектрометры Avance III 600 MHz (Bruker, Германия), Avance 700 MHz (Bruker),

фотометр планшетный со встроенной автоматической системой дозирования жидкости NOVOstar (BMG LABTECH, Германия),

фотометр планшетный Tecan Infinite F50 Plus (Tecan, Швейцария),

усилитель EPC-800 (HEKA, Германия),

система сбора данных InstruTECH LIH 8 + 8 (HEKA, Германия),

пуллер для микропипеток P-1000 flaming/brown (Sutter Instrument, Германия),

усилитель Axon Instruments GeneClamp 500 (Molecular Devices, США),

инвертированный флуоресцентный микроскоп DM ILM (Leica Microsystems, Германия),

камера Leica DFC9000GFC (Leica Microsystems, Германия),

система микроинъекций Nanolitre 2000 (World Precision Instruments, США),

усилитель GeneClamp 500 (Axon Instruments, США),

ДНК-амплификатор s1000 (Biorad, США),

система для ПЦР в реальном времени Applied Biosystems 7500 (ThermoFisher, США)

2.1.4 Биологические материалы и животные

Линии Chinese hamster ovary (CHO), стабильно экспрессирующие крысиный TRPV1, человеческий TRPV3, крысиный TRPA1 (получены в лаборатории ранее [74,167]). Линия HaCaT (Cas: 20210513, KeyGEN BioTECH, Китай).

Линия Escherichia coli DH5α.

Надземные части *Andrographis paniculata* (Lamoon, Таиланд).

Плазмидные векторы pcDNA4/TO (ThermoFisher), pcDNA3.1(+) (ThermoFisher).

Плазмидные конструкции pEG-BacMam-TRPV3-L557A, pEG-BacMam-TRPV3-A560L, pEG-BacMam-TRPV3-L563A.

Ооциты лягушек *Xenopus laevis*. 8-10 недельные самцы мышей ICR (НПП «Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН»).

2.1.5 Микробиологические среды

DMEM/F12 (1:1) (ThermoFisher, США), DMEM (PanEco, Россия), эмбриональная бычья сыворотка (HyClone, США).

2.1.6 Программное обеспечение

PatchMaster v2 × 90.5 (HEKA, Германия), GraphPad Prism 7.00 (Prism, США), LAS-X 3.7.4.23463 (Leica Microsystems, Германия), OpenBabel 3.1.1 (свободное программное обеспечение), Pymol v2.5.4 (Schrödinger, Inc., США), Rosetta-3 (https://rosie.graylab.jhu.edu, свободное программное обеспечение), Biovia Discovery Studio v24.1.0.23298 (Dassault Systèmes, Франция).

2.2 Методы

2.2.1 Экстракция и выделение активного соединения

8 г сухого материала надземных частей *Andrographis paniculata* измельчали в порошок и экстрагировали 200 мл 70% этанола с pH 9,0 (оттитрованного 1 M NaOH) в течение 18 ч при постоянном перемешивании при комнатной температуре. Полученный экстракт разбавляли в два раза дистиллированной водой и фильтровали. Затем фильтрат подвергали твердофазной экстракции на колонке Chromabond C18ec/5000мг, уравновешенной водой с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУ). Связавшуюся с колонкой фракцию элюировали 70% ацетонитрилом с добавлением 0,1% ТФУ и лиофилизировали. Затем соединение было очищено с помощью двух раундов обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием насоса Waters 1525 Binary HPLC Pump и, последовательно, колонки Jupiter C5 (250 x 10 мм) и колонки Luna PFP(2) (250 x 10 мм). Фракции элюировали в градиенте ацетонитрила от 0 до 60% в присутствии 0,1% ТФУ в течение 60 мин при скорости потока 5 мл/мин и контролировали при 210 нм с помощью детектора УФ/видимого диапазона Waters 2489. В результате этих процедур было получено 2,4 мг 14-дезокси-11,12-дидегидроандрографолида (0,03% от исходного материала).

2.2.2 Установление структуры

Жидкостная хромато-масс-спектрометрия высокого разрешения с ионизацией электроспреем была проведена с использованием системы Ultimate 3000 RSLCnano, соединенной с масс-спектрометром Orbitrap Fusion Lumos (ThermoFisher Scientific, США). Спектры MS1 и MS2 были записаны с разрешением 30K и 15K, соответственно, с фрагментацией с помощью диссоциации, индуцированной столкновениями.

Для спектроскопии ядерного магнитного резонанса образец был растворен в *d*6-диметилсульфоксиде (*d*6-ДМСО). Спектры были записаны на спектрометрах Bruker Avance III 600 MHz или Bruker Avance 700 MHz с криодатчиком с импульсным градиентом магнитного поля.

2.2.3 Сайт-направленный мутагенез

Человеческий TRPV3, введенный в вектор pcDNA4/TO, был использован в качестве матрицы для ПЦР-мутагенеза. Мутант L664S был получен с использованием полимеразы PfuSE (СибЭнзим) в соответствии с протоколом для сайт-направленного

мутагенеза QuikChange (Agilent, США). Комплементарные праймеры имели следующие последовательности:

прямой, CATCACCTATGTCATCAGCACCTTTGTTCTCCTCC;

обратный, GGAGGAGAACAAAGGTGCTGATGACATAGGTGATG.

ПЦР-продукт был обработан DpnI FastDigest и использован для трансформации *E. coli* DH5α. Конструкции TRPV3 L557A, A560L и L563A в векторе pEG-BacMam были получены в лаборатории А. И. Соболевского (Колумбийский университет) [10]. Мутации были подтверждены с помощью секвенирования по Сэнгеру полных генов.

2.2.4 Синтез кРНК

КРНК человеческого TRPV3 была синтезирована на матрице TRPV3-pcDNA3.1(+), линеаризованной с помощью PvuI, с использованием набора mMESSAGE mMACHINE® (ThermoFisher) в соответствии с протоколом производителя для транскриптов с 5’-кэпом.

2.2.5 Ведение клеточных культур

Линии CHO культивировались в DMEM/F12 (1:1) (ThermoFisher, США) с 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 U/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина при 37 º C и 5% CO_2.

Линия HaCaT культивировалась в DMEM (PanEco, Россия) с добавлением 4,5 г/л глюкозы, 2 мМ L-глутамина и 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 U/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина при 37 º C и 5% CO_2.

2.2.6 Экспрессия каналов в CHO и получение стабильных линий

В работе использовались клеточные линии CHO, стабильно экспрессирующие крысиный TRPV1, человеческий TRPV3 и крысиный TRPA1, полученные в лаборатории ранее.

Клеточная линия CHO, стабильно экспрессирующая человеческий TRPV4 (TRPV4-CHO), была получена аналогично с использованием набора реактивов T-Rex System. Ген TRPV4 был клонирован в вектор pcDNA4/TO, который способен обеспечивать индуцибельную экспрессию в клеточных линиях млекопитающих. Клетки CHO, несущие регуляторный вектор pcDNA6/TR, который кодирует репрессор тетрациклина (CHO-TR), были трансфицированы плазмидой pcDNA4/TO-TRPV4. Для трансфекции клеток использовали липофектамин 2000 (ThermoFisher). После 2 недель отбора с помощью бластицидина (5 мкг/мл) и зеоцина (250 мкг/мл) наличие функционального канала в

отдельных колониях было протестировано с помощью агониста TRPV4 GSK1016790A в флуоресцентном кальциевом тесте. Экспрессию TRPV4 индуцировали добавлением тетрациклина в дозе до 1 мкг/мл за 24 часа до тестирования. Положительные клоны были использованы для дальнейших экспериментов.

Линия CHO, стабильно экспрессирующая TRPV3 L664S, была получена аналогично.

Клетки, временно трансфицированные конструкциями на основе pEG-BacMam, несущими мутанты TRPV3, использовались для флуоресцентного кальциевого имиджинга через 48 и 72 часа после трансфекции.

2.2.7 Флуоресцентный кальциевый тест

Флуоресцентный кальциевый тест проводили с использованием планшетного считывателя со встроенной автоматической системой дозирования жидкости NOVOstar. Клетки CHO, экспрессирующие TRP каналы, высевали в 96-луночные планшеты с черными стенками и прозрачным дном с плотностью 75 тысяч клеток на лунку (полная среда, содержащая 1 мкг/мл тетрациклина для индукции экспрессии каналов) и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO_2. Далее клетки окрашивали цитоплазматическим индикатором кальция Fluo-4AM с использованием набора Fluo-4 Direct Calcium Assay Kit и последовательно инкубировали в 60 минут темноте при 37°C и 20-60 минут при комнатной температуре (22–25°C).

Изменения флуоресценции Fluo-4AM (λex = 485 нм, λem = 520 нм) измеряли при комнатной температуре. Тестируемые соединения были свежеприготовлены в сбалансированном солевом растворе Хэнка (HBSS) из исходных стоковых растворов в 100% ДМСО и добавлялись в лунки вручную. Одна лунка использовалась для одной тестируемой концентрации.

2.2.8 Флуоресцентный кальциевый имиджинг

Для флуоресцентного кальциевого имиджинга (визуализации отдельных клеток) клетки высевали и красили Fluo-4AM аналогично кальциевому тесту с тем отличием, что для имиджинга клетки высевали в количестве 50 тысяч на лунку.

Перед микроскопией клеточную среду заменяли сбалансированным солевым раствором Хэнка (HBSS) с добавлением 20 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты). Имиджинг проводился с помощью камеры Leica DFC9000GFC (Leica Microsystems, Германия), подключенной к инвертированному

флуоресцентному микроскопу DM ILM (Leica Microsystems). Управление камерой осуществлялось через приложение LAS-X 3.7.4.23463 (Leica Microsystems).

Первичный анализ серии изображений выполнялся в LAS-X. Для этого выбирались регионы интереса, которые соответствовали отдельным клеткам, и значения интенсивности флуоресценции за время записи экспортировались в табличном формате. Затем для каждой интересующей области рассчитывались относительные интенсивности флуоресценции ($\Delta F/F_0$) как интенсивность флуоресценции в конечной точке (F) за вычетом базовой интенсивности флуоресценции в начальной точке (F_0), деленная на базовую интенсивность флуоресценции (F_0).

2.2.9 Записи токов от клеток CHO

Токи от целых клеток CHO записывали методом локальной фиксации потенциала (пэтч-кламп), используя усилитель EPC-800 (HEKA, Германия), систему сбора данных InstruTECH LIH 8 + 8 (HEKA) и программное обеспечение PatchMaster v2x90.5 (HEKA). Бескальциевый внеклеточный раствор содержал (в мМ) 145 NaCl, 5 KCl, 1 $MgCl_2$, 15 глюкозы, 10 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES), pH 7,4 (оттитрован 1 M NaOH). Пэтч-пипетки изготавливались из боросиликатного стекла с филаментом при помощи пуллера P-1000 flaming/brown micropipette puller (Sutter instrument). Внутренний раствор содержал (в мМ) 130 CsCl, 5 1,2-бис(о-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусную кислоту (BAPTA), 10 HEPES. Сопротивление пэтч-пипеток по заполнении внутренним раствором составляло от 3 до 5 МОм. Удерживаемый потенциал мембраны составлял 0 мВ. Токи записывались при линейном изменении потенциала («рэмп») от −80 до +80 мВ (за 160 мс), подаваемом каждые 2 с.

2.2.10 Записи токов от ооцитов Xenopus laevis

После выделения здоровые ооциты IV-V стадий без наружных оболочек сортировали вручную и хранили в среде ND96 (96 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 1,8 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$ и 5 мМ HEPES, оттитрованной NaOH до pH 7,4). Через 16–18 ч после выделения ооцитов 2–10 нг кРНК ASIC1a крысы и ASIC3 человека или 4-8 нг кРНК TRPV3 вводили с использованием системы микроинъекций Nanolitre 2000 (World Precision Instruments). После инъекции ооциты выдерживали в течение 2–3 дней при температуре 18 °C, а затем до 3 дней для ASIC каналов или до 7 дней для TRPV3 при температуре 15 °C в среде ND96 с добавлением гентамицина (50 мкг/мл). Токи от целых клеток записывались

с использованием двухэлектродной фиксации потенциала с помощью усилителя GeneClamp 500 (Axon Instruments) при удерживаемом потенциале −50 мВ. Токи ASIC каналов записывались при постоянном удерживаемом потенциале, а токи от TRPV3 при линейном изменении потенциала от −80 до +80 мВ за 200 мс. Микроэлектроды были заполнены 3 M KCl. В качестве омывающего раствора использовался ND96 (pH 7,4). Активирующим раствором для ASIC каналов (pH 5,5) был ND96, в котором 5 мМ HEPES были заменены на 10 мМ 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES).

2.2.11 Анализ концентрационных зависимостей

Анализ концентрационных зависимостей проводился в GraphPad Prism 7.00 с помощью уравнения Хилла в случае активации в виде

$Y / Y_{max} = 1 / (1 + (EC_{50} / [L])^{n_H})$,

в случае ингибирования в виде

$Y / Y_{max} = 1 / (1 + ([L] / IC_{50})^{n_H})$,

где Y – ответ в виде амплитуды ионного тока или относительной интенсивности флуоресценции, Ymax – максимальный ответ, [L] – концентрация лиганда, EC_{50} – полумаксимальная эффективная концентрация активатора, IC_{50} – полумаксимальная эффективная концентрация ингибитора, n_H – коэффициент Хилла.

Использованное в работе уравнение Гаддума-Шильда имело вид

$\lg (KO - 1) = \lg [I] + pK_B$,

где концентрационное отношение (КО) – это отношение EC_{50} в присутвии ингибитора с цонцентрацией [I] к EC_{50} в отсутствии ингибитора, K_B – равновесная константа диссоциации комплекса ингибитора и рецептора.

Использованное уравнение Ченга-Прусоффа имело вид

$K_i = IC_{50} / (1 + [A] / EC_{50})$,

где K_i – константа ингибирования, [A] – концентарция активатора.

Стандартные ошибки для pK_B и pK_i были рассчитаны с помощью дельта-метода для расчета погрешности при логарифмических преобразованиях.

2.2.12 Тестирование тепловой активации

За 24 часа до тестирования клетки rTRPV1-CHO, hTRPV3-CHO и CHO-TR высевали в 6-луночные планшеты в количестве $1,2 \times 10^6$ клеток на лунку в полной питательной среде. Для TRPV-экспрессирующих линий в среду добавляли тетрациклин до концентрации 1 мкг/мл. На следующий день клетки загружались Fluo-4 по протоколу,

описанному выше. Далее клетки промывали раствором HBSS, содержащим дополнительно 1,25 мМ пробеницида и 20 мМ HEPES, и снимали с подложки с помощью раствора Версена (0,2 г/л этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в фосфатно-солевом буфере). Полученную клеточную суспензию разбавляли в два раза раствором HBSS/пробеницид/HEPES и центрифугировали в течение 1 мин при 100 g. Осадок ресуспендировали в 0,9 мл HBSS/пробеницид/HEPES и раскапывали (по 10–12 тыс. клеток в 20 мкл) в 96-луночные ПЦР-планшеты UltraFlux (Scientific Specialties, США). Исследуемые соединения (20 мкл), приготовленные в HBSS/пробенецид/ХЕПЕС, добавляли до конечного объема 40 мкл. Планшеты герметизировали пленкой Platemax cyclerseal (Corning, США).

Измерения проводили с использованием системы для ПЦР в реальном времени Applied Biosystems 7500 (ThermoFisher Scientific, США). Перед началом температурных циклов планшет выдерживали при 25 °C в течение 5 мин. Протокол нагрева включал 30-секундные этапы в каждой температурной точке, что было достаточно для стабилизации и регистрации флуоресцентного сигнала. Полученные значения флуоресценции для каждой температурной точки (T) нормировали на базовый уровень при 25 ºC (относительная флуоресценция, $F_{норм}$). Для выделения специфического кальциевого ответа TRPV каналов и исключения температурных артефактов полученные значения дополнительно нормировали на относительную флуоресценцию контрольных (пустых) клеток CHO-TR для каждой температуры. Каждое измерение проводили в 3–8 технических повторах, средние значения которых использовали для последующего анализа.

2.2.13 Анализ тепловой активации

Аппроксимации данных и визуализацию проводили в GraphPad Prism 9.5.1. Значения прироста флуоресценции в TRPV-экспрессирующих клетках по сравнению с пустыми клетками ($F_{норм}$ (TRPV-CHO)/$F_{норм}$(CHO-TR)) для каждой T принимались за меру вероятности открытого состояния канала P_o. Для получения нормализованных значений P_o значения прироста отдельно для каждого независимого повтора аппроксимировались сигмоидальной функцией Больцмана:

$$Y = Y_{min} + (Y_{max} - Y_{min}) / (1 + \exp((T_{1/2} - T) / k),$$

где Y – прирост флуоресценции, Y_{max} – верхнее плато насыщения, Y_{min} – нижнее плато, T – температура в градусах Цельсия, $T_{1/2}$ – температура полумаксимальной активации, k – наклон кривой.

Далее P_o совместно от всех независимых повторов аппроксимировались функцией Больцмана при $Y_{max} = 1$ для получения точного $T_{1/2}$.

Из P_o рассчитывались равновесные константы (K_{eq}) при каждой T: $K_{eq} = P_o/(1-P_o)$.

Коэффициент температурной чувствительности Q_{10} рассчитывался по формуле:

$Q_{10} = (P_2/P_1)^{(10/(T_2-T_1))}$,

где P_1 и P_2 – вероятности открытого состояния при T_1 и T_2.

Уравнение Вант-Гоффа, использованное для аппроксимации и расчета энтальпии и энтропии, имело вид (взято из [168]):

$\ln(K_{eq}) = \ln(K_{1/2}) - (\Delta H/R)*(1/T - 1/T_{1/2})$,

где ΔH – изменение энтальпии, R – газовая постоянная, T – температура в кельвинах, $K_{1/2}$ – равновесная константа в точке $T_{1/2}$.

Изменение энтропии ΔS рассчитывалось одновременно с аппроксимацией уравнением Вант-Гоффа, согласно зависимости: $\Delta S = \Delta H/T_{1/2}$.

2.2.14 Тестирование на цитотоксичность

Тестирование на цитотоксичность проводили с помощью Cell Counting Kit – 8 в соответствии с рекомендациями к набору. Клетки HaCaT (100 мкл) высевали в 96-луночный планшет (20 тыс. клеток на лунку) и инкубировали 24 часа перед анализом при 37°C, 5% CO_2. Затем добавляли 10 мкл тестируемого соединения до желаемых концентраций и инкубировали еще 24 часа. Готовый к применению краситель добавляли в лунки (10 мкл) и инкубировали в течение 3 ч. Оптическое поглощение измеряли на длине волны 450 нм с помощью планшетного фотометра Tecan Infinite F50 Plus.

2.2.15 Молекулярный докинг

Трехмерные структуры DDA и CBD были экспортированы из PubChem и отформатированы для дальнейшего анализа в OpenBabel 3.1.1 [169]. Структуры TRPV3 были экспортированы из PDB. Сначала было выполнено предсказание сайта связывания на целом канале («слепой докинг») в PyRx 0.8, где используется встроенная программа для докинга Autodock Vina [170]. Минимизация энергии лигандов была выполнена с помощью OpenBabel, встроенной в PyRx. Далее, предсказание позы лиганда было выполнено с помощью веб-интерфейса ROSIE, который работает на программном обеспечении Rosetta-3 [171]. В качестве начальных координат лиганда использовались координаты из лучшей модели, полученной в PyRx, экстрагированные с использованием

Pymol v2.5.4. Ограничение на максимальное количество конформеров составляло 200, а радиус поиска от начальных координат составлял 5 Å. 200 полученных моделей представляют собой независимые запуски, поэтому эквивалентны независимым повторностям. Полученные модели были отсортированы, начиная с наименьшего значения параметра «delta interface ligand», который соответствует энергии образования комплекса [171]. Дальнейший анализ был проведен с использованием PyMOL и Biovia Discovery Studio v24.1.0.23298.

2.2.16 Поведенческие модели зуда

Исследования на животных проводились в соответствии с международными принципами Всемирной организации здравоохранения по проведению биомедицинских исследований с участием животных (World Health Organization’s International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals). Все процедуры проводились согласно принципам ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 18.03.1986). Протоколы использования животных были одобрены институциональной политикой по использованию лабораторных животных Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Для *Xenopus laevis* – номер протокола 351/2022, дата утверждения: 24.11.2022. Для мышей – номер протокола 891/22, дата утверждения: 17.05.2022.

В поведенческих моделях зуда использовались самцы мышей ICR в возрасте 8-10 недель. Правую сторону ростральной части шеи, куда вводились препараты, выбривали за 24 часа до начала эксперимента. Перед испытаниями мышей помещали в наблюдательный бокс (длина, ширина и высота: 9×9×13 $см^3$) для акклиматизации на 30 минут. Внутрикожные инъекции производились инсулиновыми шприцами объемом 0,3 мл (иглы 30G) BD Micro Fine Plus Demi U100 (Becton Dickinson). Для оценки пруритогенного (вызывающего зуд) эффекта DDA внутрикожно вводили носитель (0,5 % ДМСО в физиологическом растворе) или DDA (3, 30, 100 мкМ) в объеме 50 мкл и подсчитывали приступы расчесывания в течение 30 минут. Для оценки противозудного эффекта DDA 50 мкл пруритогена (карвакрол, 1%, или дигидрохлорид гистамина, 2 мг/мл, или 11 мМ) вводили внутрикожно через 30 мин после инъекции носителя или DDA. Лоратадин (10 мг/кг) вводили перорально за 30 мин до инъекции гистамина. Поведение мышей записывали на видео. Один приступ расчесывания подсчитывался, когда мышь поднимала

правую заднюю конечность к месту инъекции и непрерывно почесывалась в течение некоторого времени, прежде чем вернуть конечность в рот или на дно камеры. Все поведенческие эксперименты проводились с использованием двойного слепого метода.

3. Результаты и обсуждение

3.1 Выделение и идентификация 14-дезокси-11,12-дидегидроандрографолида

3.1.1 Фракционирование и скрининг экстрактов

В рамках этой работы поиск новых лигандов TRPV3 проводился в экстрактах растений. Экстракты растений представляют собой природные библиотеки биологически активных вторичных метаболитов. Соединения растительного происхождения занимают значительную долю среди известных лигандов TRPV3 (см. главу 1.4 Обзор лигандов TRPV3), что указывает на перспективность их изучения. Для поиска активных молекул использовались растения, о которых имеется информация об их противоболевом и противовоспалительном действии, в первую очередь, растения, используемые в традиционной медицине.

Стратегия анализа представляла собой классический подход, включающий экстракцию, хроматографическое фракционирование и параллельное биологическое тестирование фракций (Рисунок 5).

Использованные в работе TRP каналы (TRPV1, TRPV3, TRPV4, TRPA1) проницаемы для кальция, поэтому возможно исследование их функции с помощью регистрации притока кальция в цитоплазму при добавлении к клеткам химических активаторов. В качестве тест-системы использовалась линия CHO, стабильно экспрессирующая человеческий ортолог TRPV3 (hTRPV3-CHO), и флуоресцентный индикатор цитоплазматического кальция Fluo-4AM. Скрининг экстрактов и фракций проводился с помощью планшетного считывателя со встроенной автоматической системой дозирования жидкости NOVOstar, что повышало производительность. В результате работы было протестировано 12 экстрактов растений, четыре из которых проявили активность на hTRPV3-CHO. Наиболее эффективным оказался водно-этанольный экстракт андрографиса метельчатого (*Andrographis paniculata*), который показал значительное ингибирование ответов hTRPV3-CHO на активатор 2-APB (Рисунок 5 Б).

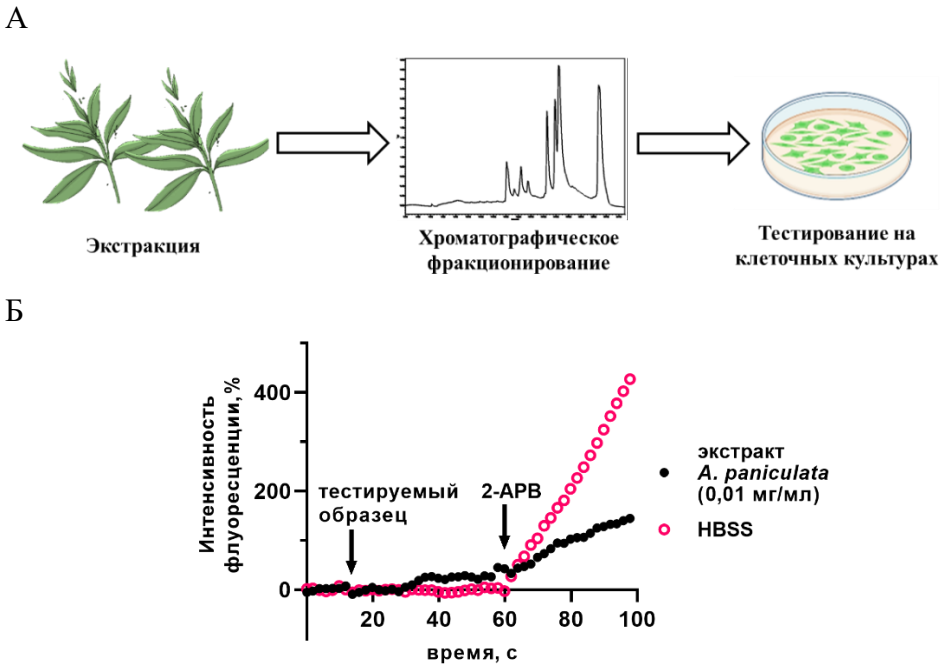


Рисунок 5. Скрининг и активность экстракта *Andrographis paniculata*. (А) Стратегия поиска новых лигандов TRPV3. (Б) Действие экстракта *A. paniculata* после твердофазной экстракции (0,01 мг/мл) на приток кальция, вызванный 300 мкМ 2-APB, в hTRPV3-CHO, по сравнению со сбалансированным солевым раствором Хэнка (HBSS).

3.1.2 Идентификация активного компонента A. paniculata

Экстракт *A. paniculata* после твердофазной экстракции был фракционирован с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (Рисунок 6).

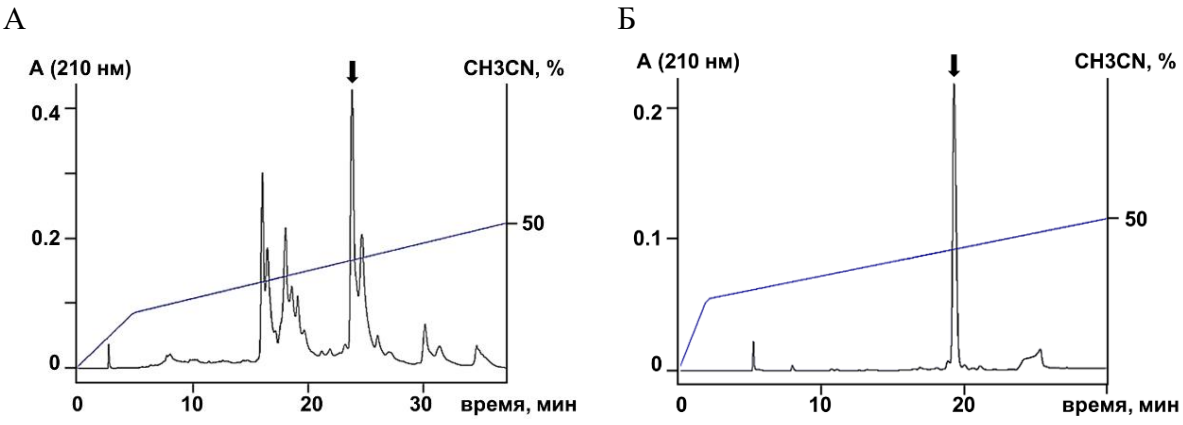
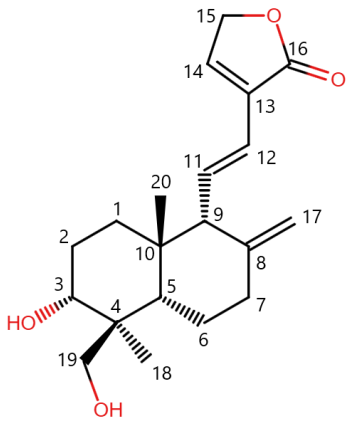


Рисунок 6. (А) Разделение экстракта методом ВЭЖХ на колонке Jupiter C5 (250 x 10 мм) в градиенте ацетонитрила в присутствии 0,1% ТФУ. Стрелками обозначены фракции, содержащие DDA. (Б) Очистка активного вещества методом ВЭЖХ на колонке Luna PFP(2) (250 x 10 мм) в градиенте ацетонитрила в присутствии 0,1% ТФУ.

В результате был выделен чистый активный компонент, структура которого была установлена с помощью набора гетероядерных спектров ЯМР и масс-спектров высокого разрешения. Анализ спектров ЯМР выявил присутствие группы CH_2 с двойной связью, трех ароматических/CH-групп с двойной связью, одной CH-O и двух CH_2-O-фрагментов (Таблица 6).

Таблица 6. Химические сдвиги DDA в *d*6-ДМСО.

Атом	**1H**	**13C**	**Атом**	**1H**	**13C**
1	1.33 (m) 1.13 (m)	38.5	11	6.75 (dd, 16/10 Hz)	134.8
2	1.62(m) 1.57(m)	28.1	12	6.13 (d, 16 Hz)	121.7
3	3.23 (dd, 5/11 Hz)	79.1	13	-	127.6
4	-	42.8	14	7.65 (t, 1.8 Hz)	147.2
5	1.17 (dd, 2/13 Hz)	54.2	15	4.89 (d, 1.8 Hz)	70.6
6	1.73 (m) 1.41 (m)	23.7	16	-	172.9
7	2.37 (ov.) 1.99 (m)	36.7	17	4.43 (d, 1.6 Hz) 4.73 (d, 1.6 Hz)	108.6
8	-	149.5	18	1.09 (s)	23.5
9	2.37 (ov.)	61.1	19	3.86 (d, 11 Hz) 3.29 (d, 11 Hz)	63.1
10	-	38.7	20	0.77(s)	15.9



По данным гетероядерной корреляционной спектроскопии (HMBC) была предложена двумерная структура, которая соответствовала 14-дезокси-11,12-дидегидроандрографолиду (DDA), дитерпеноиду лабданового типа, который известен как один из основных компонентов *Andrographis paniculata* [172]. Предложенная структура соответствовала данным масс-спектрометрии: m/z 665,4054 $[2M + H]^+$ (рассчитано для $C_{20}H_{28}O_4$ 665,4053), 687,3870 $[2M + Na]^+$ (рассчитано для $C_{20}H_{28}O_4$ 687,3873), 333,2061 $[M + H]^+$ (рассчитано для $C_{20}H_{28}O_4$ 333,2065). Чтобы окончательно удостовериться в предложенной структуре, мы сравнили спектр $^{1}H,^{13}C$-HSQC DDA со спектром коммерчески доступного 14-дезокси-11,12-дидегидроандрографолида. Анализ подтвердил идентичность двух соединений (Рисунок 7).

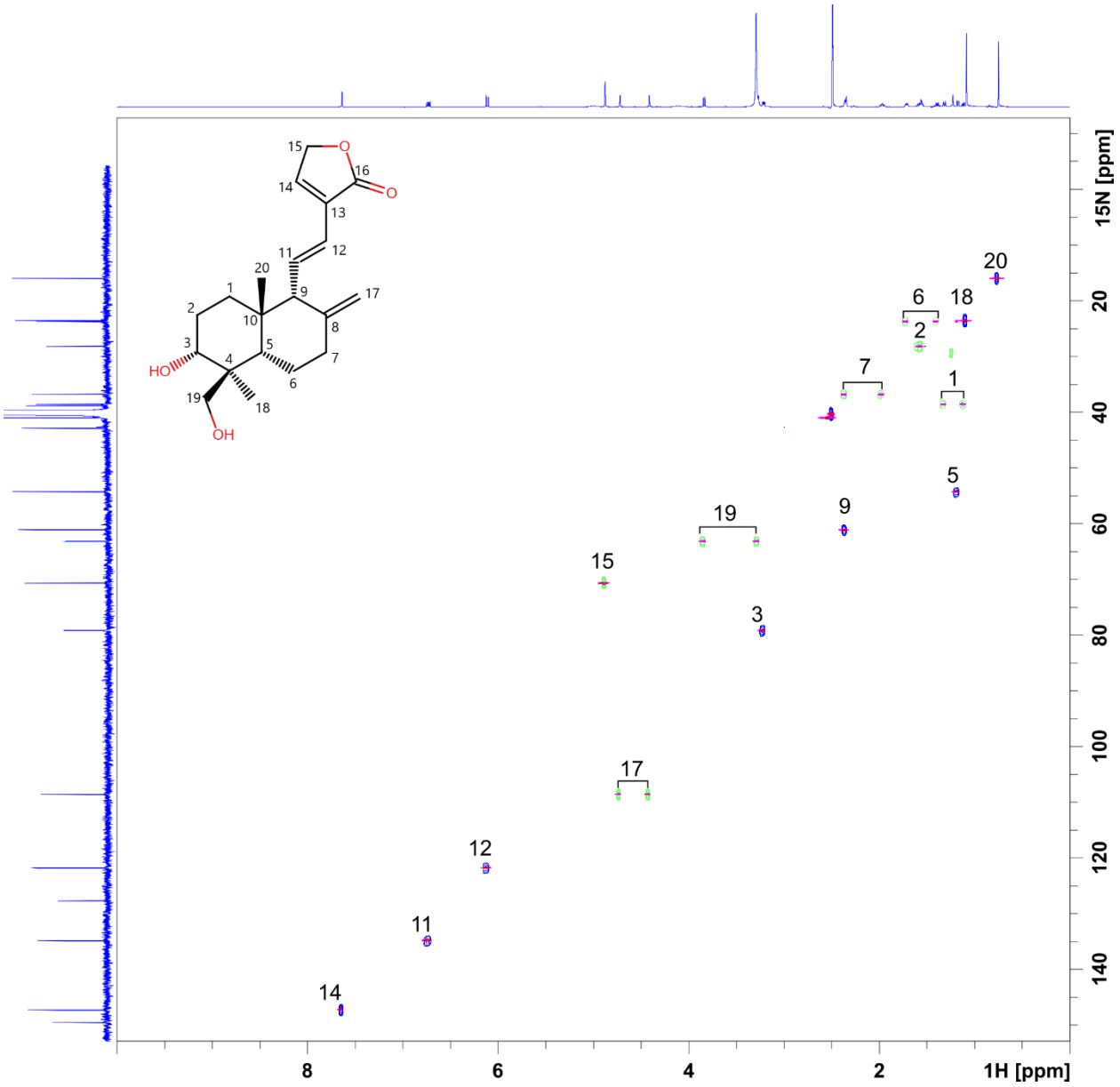


Рисунок 7. Наложение 2D спектров ^{1}H,^{13}C-HSQC с коррекцией мультиплетности выделенного 14-дезокси-11,12-дидегидроандрографолида (DDA) (фиолетовый (CH, CH_3), красный (CH_2)) и коммерчески приобретенного DDA (синий (CH, CH_3) и зеленый (CH_2)). Одномерные ^{1}H и ^{13}C спектры DDA представлены по верхнему и левому краю от 2D спектра.

Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees (Acanthaceae) – травянистое растение Южной и Юго-Восточной Азии, экстракты которого используются в традиционной медицине региона в качестве противовоспалительного и жаропонижающего средства при простуде [148,149]. Имеются многочисленные сообщения о том, что фармакологический спектр свойств экстракта *A. paniculata* шире и включает обезболивающее, противоопухолевое, противодиабетическое, антимикробное, антиоксидантное,

гепатопротекторное и иммуномодулирующее действие [173]. В то же время, молекулярные мишени и активность отдельных компонентов этого растения изучены недостаточно. Из литературных данных известно, что химический состав *A. paniculata* представлен в основном флавоноидами и дитерпеноидами лабданового типа [173]. Андрографолид считается основным лабдановым дитерпеноидом для данного растения, и другие дитерпеноиды рассматриваются как его производные, в частности, 14-дезокси-11,12-дидегидроандрографолид (DDA).

Некоторые димерные лабдановые дитерпеноиды из *A. paniculata* способны активировать TRP каналы. В частности, бисандрографолид А селективно активировал TRPV4 в субмикромолярных концентрациях [174]. Пять необычных димерных *ent*-лабдановых дитерпеноидов в условиях микроскопического термофореза также демонстрировали связывание с TRPV1, TRPV3 и TRPV4 с варьирующейся селективностью, однако, как связывание с TRPV3 влияло на функционирование канала (активация/ингибирование) не было уточнено [44]. В данной работе впервые идентифицировано мономерное производное андрографолида (DDA) ингибирующее TRPV3, что позволяет говорить о новом структурном типе ингибиторов TRPV3.

3.2 Активность DDA in vitro

3.2.1 Селективность действия

Селективность наиболее активных ингибиторов канала варьируется. Некоторые синтетические молекулы, такие как трпвицин (IC_{50} 0,41 мкМ) [68], 8c (IC_{50} 0,086 мкМ) [64], 74a (IC_{50} 0,38 мкМ) [65] демонстрировали достаточно высокую селективность ингибирования TRPV3. Среди ингибиторов растительного происхождения изохлорогеновая кислота B (IC_{50} 0,9 мкМ) также не проявляла кросс-реактивности к TRPV1, TRPV4 и TRPA1 в концентрациях ниже 50 мкМ [55]. Напротив, α-мангостин (IC_{50} 0,077 мкМ) ингибировал TRPV1, TRPV4 и TRPA1 в низкомикромолярном диапазоне концентраций [58]. Эндогенный противовоспалительный липид, 17(R)-резолвин D1 (IC_{50} 0,398 мкМ), селективно ингибировал TRPV3 в концентрациях ниже 3 мкМ, но его проразрешающее действие на лейкоциты находится в пико-и наномолярных концентрациях [50].

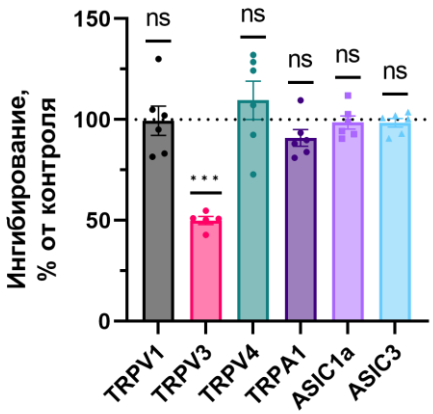


Рисунок 8. Действие DDA (20 мкМ) на панель ионных каналов. n = 4-6. Одновыборочный t-критерий Стьюдента. ns $p \geq 0,05$, *** $p < 0,001$.

Для установления селективности мы протестировали DDA на панели, включающей термо-TRP каналы (крысиный TRPV1, человеческий TRPV4, крысиный TRPA1), а также кислоточувствительные ионные каналы ASIC1 крысы и ASIC3 человека, участвующие в развитии боли, зуда и воспаления. Для этого мы использовали флуоресцентный кальциевый тест для TRP каналов, экспрессированных в стабильных линиях CHO, и записи токов с двухэлектродной фиксацией потенциала для ASIC каналов, экспрессированных в ооцитах *Xenopus laevis* (Рисунок 8). DDA (20 мкМ) продемонстрировал выраженную селективность в отношении TRPV3 в исследуемой

панели, что позволило провести дальнейшее детальное исследование его TRPV3-ингибирующей активности.

3.2.2 Действие на ионные токи в клетках hTRPV3-CHO

Далее мы детально охарактеризовали действие DDA на hTRPV3-CHO методом пэтч-кламп в конфигурации целой клетки. В этих экспериментах мы использовали номинально бескальциевый внеклеточный раствор и BAPTA во внутреннем растворе для хелатирования внутриклеточного кальция, поскольку вне- и внутриклеточный кальций существенно замедляют активацию канала. Активацию токов TRPV3 вызывали нанесением 100 мкМ 2-APB при повторяющемся линейном изменении («рэмпе») потенциала мембраны от −80 до +80 мВ. Прямое нанесение DDA на клетки не вызывало активации каналов. Совместное нанесение 2-APB и DDA снижало амплитуды входящих и выходящих токов TRPV3. Ингибирование имело практически одинаковую эффективность на отрицательных и положительных потенциалах, что позволяет исключить блокаду поры канала. При отмывке веществ и последующем нанесении только 2-APB не наблюдалось восстановление амплитуд ионных токов. При этом, последовательное нанесение чистого 2-APB практически не вызывало уменьшения амплитуды токов («run-down»), из чего можно утверждать, что эффект, наблюдаемый при нанесении DDA, обусловлен именно ингибированием канала (Рисунок 9 А, Б, В).

Концентрационная зависимость была проанализирована при помощи уравнения Хилла. Полученные параметры активности и эффективности ингибирования имели сходные значения на положительных и отрицательных потенциалах мембраны: на +80 мВ, IC_{50} = 0,80 ± 0,19 мкМ, максимальное ингибирование 49 ± 5 %, n_H 1,4 ± 0,4; на −80 мВ, IC_{50} = 0,56 ± 0,17 мкМ, максимальное ингибирование 50 ± 6 %, n_H 1,6 ± 0,8 (Рисунок 9 Г). Также, мы построили кривые активации 2-APB в присутствии 10 мкМ DDA и в отсутствии DDA. Совместное нанесение с DDA привело к почти двукратному снижению максимальной эффективности 2-APB: 100 ± 14 % без DDA против 53 ± 9 % в присутствии DDA (Рисунок 9 Д).

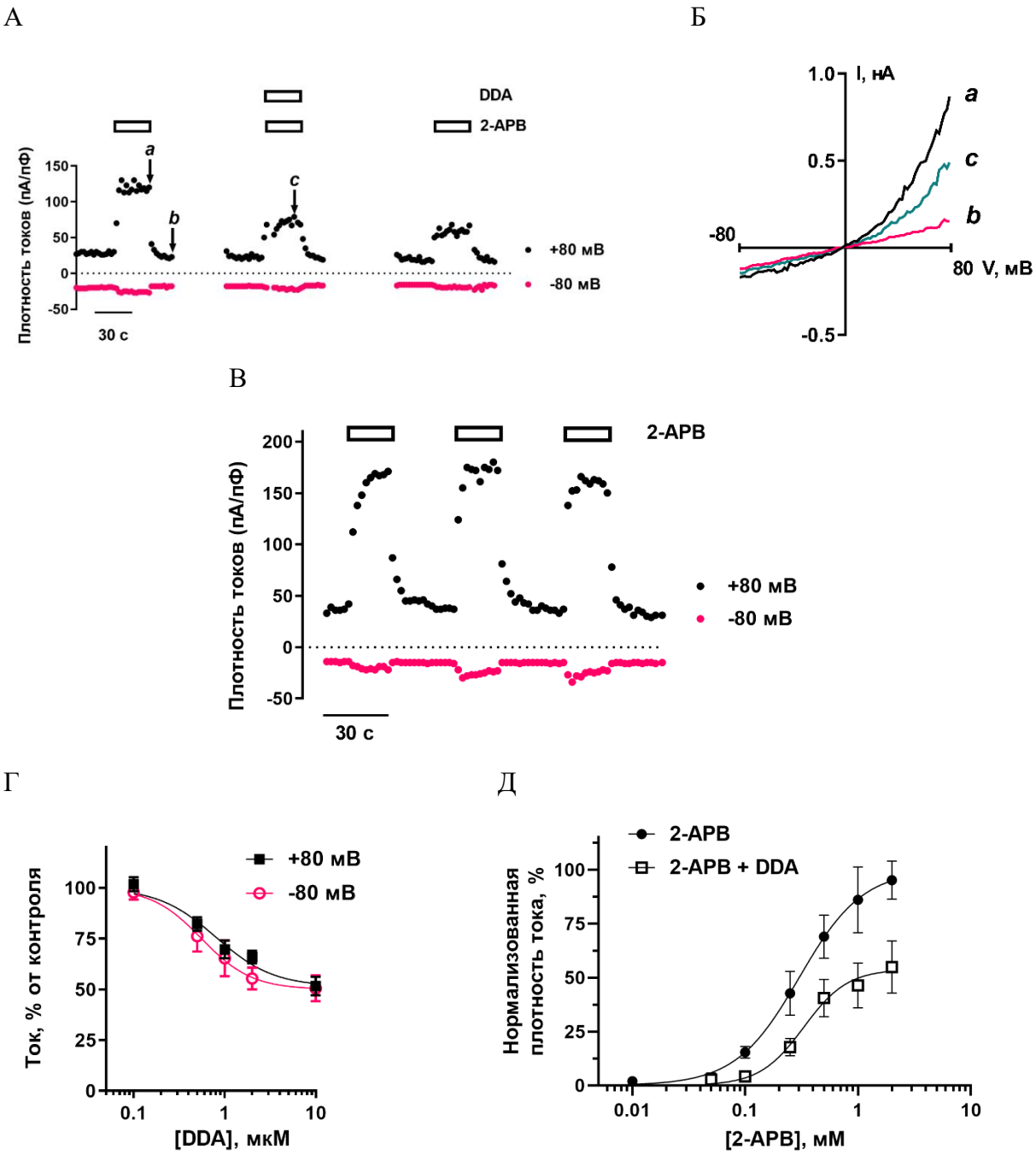


Рисунок 9. Действие DDA на токи от hTRPV3-CHO. (А) Репрезентативные токи от целой клетки, вызванные нанесением 100 мкМ 2-APB, совместным нанесением 2-APB и 10 мкМ DDA, и нанесением 2-APB после отмывки ингибитора. (Б) Зависимости тока при изменении мембранного потенциала от 80 до +80 мВ в моменты времени, обозначенные буквами (a, b, c) на панели А. (В) Репрезентативные токи от целой клетки, вызванные последовательным нанесением 100 мкМ 2-APB. (Г-Д) Концентрационные зависимости действия DDA. (Г) Кривые ингибирования амплитуд токов, вызванных 100 мкМ 2-APB, при совместном нанесении с DDA при потенциалах −80 и +80 мВ (n = 5, 6). (Д) Кривые

активации токов, вызванных 2-APB или совместным нанесением 2-APB с 10 мкМ DDA, при +80 мВ (n = 5, 6).

3.2.3 Действие на приток кальция в кератиноцитах

Поскольку TRPV3 играет важную роль в физиологии кератиноцитов, мы протестировали DDA на клеточной линии кератиноцитов человека HaCaT, которая обильно экспрессирует функциональные TRPV3 [163]. В условиях Fluo-4 кальциевого теста активатор TRPV3 карвакрол в концентрации 500 мкМ вызывал значительный приток кальция, который дозозависимо подавлялся DDA (Рисунок 10). Концентрационная зависимость ингибирования на кератиноцитах была похожа на полученную в условиях измерения ионных токов на hTRPV3-CHO: IC_{50} = 0,85 ± 0,27 мкМ, максимальное ингибирование 43 ± 6 %, n_H 1,4 ± 0,4. Таким образом, DDA эффективно ингибирует эндогенно экспрессируемые TRPV3.

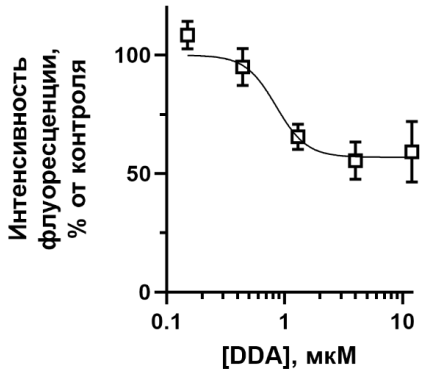


Рисунок 10. Концентрационная зависимость действия DDA на приток кальция, вызванный 500 мкМ карвакрола, в человеческих кератиноцитах HaCaT (n = 5, 6). Активатор наносился после 5-минутной преинкубации с DDA.

3.2.4 Различное действие на 2-APB- и CBD-опосредованную активацию TRPV3

Далее в ходе более глубокого изучения механизма действия DDA мы сравнили ингибирующий эффект при использовании различных активационных стимулов. Для этого мы использовали кальциевый Fluo-4 имиджинг и hTRPV3-CHO в качестве клеточной модели.

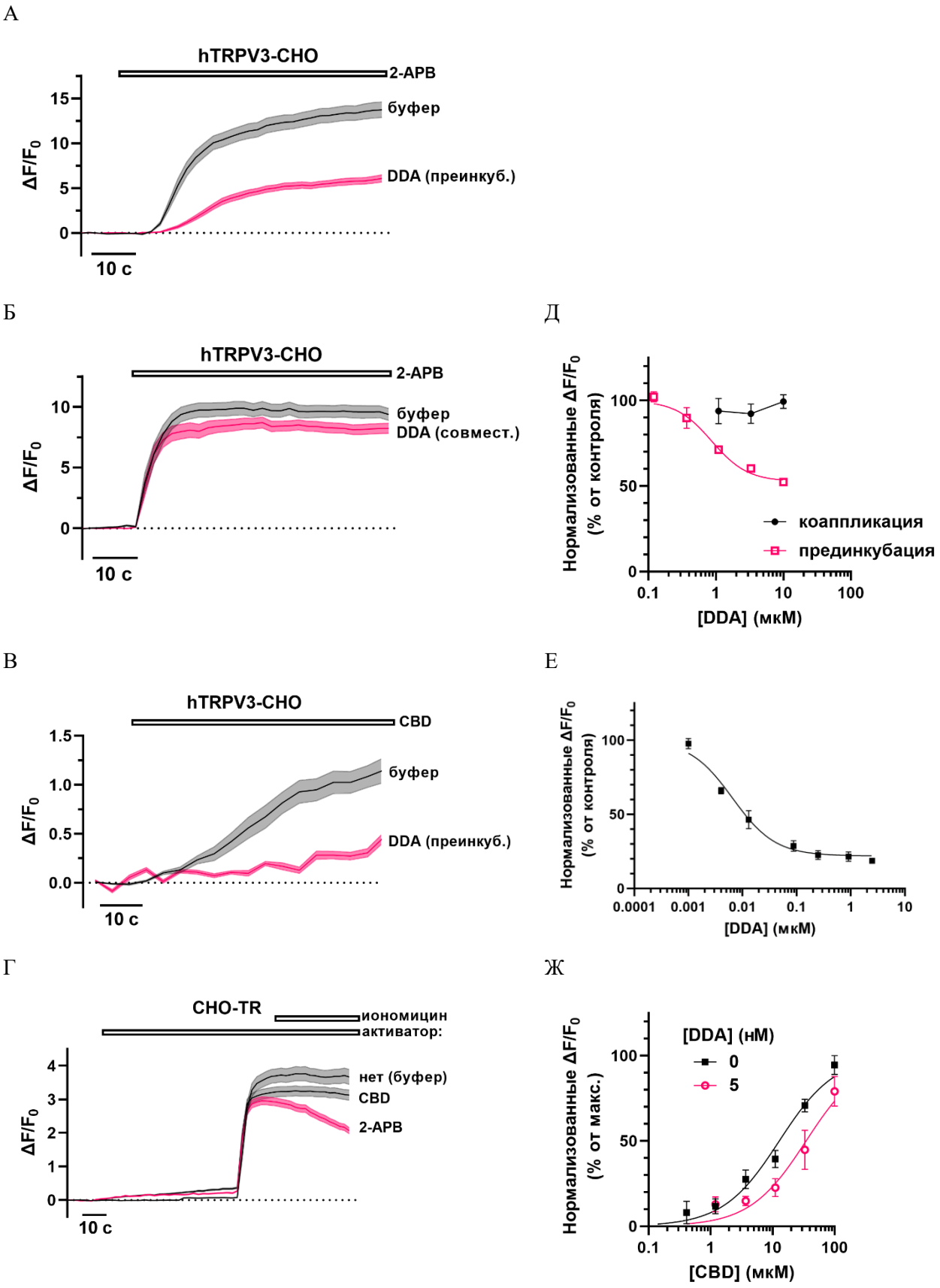


Рисунок 11. Ингибирование притока кальция под действием DDA в hTRPV3-CHO. (А-В) Репрезентативные записи притока кальция в hTRPV3-CHO ответ на 100 мкМ 2-APB после 5-минутной прединкубации (А) или при совместном нанесении с 10 мкМ DDA (Б), в

ответ на 15 мкМ CBD после 5-минутной прединкубации с 0,8 мкМ DDA (В). (Г) Репрезентативные записи притока кальция в нетрансфицированных клетках CHO-TR в ответ на HBSS (буфер), 100 мкМ 2-APB или 100 мкМ CBD с последующим нанесением 4 мкМ иономицина. Окрашенные зоны показывают стандартную ошибку среднего, черные линии – средние значения. Записи усреднены от 20-60 клеток. (Д) Концентрационные зависимости ингибирования 2-APB-вызванного притока кальция (100 мкМ) в ответ на совместное нанесение с DDA или после 5-минутной прединкубации с DDA. Для прединкубации IC_{50} = 0,87 ± 0,18 мкМ, максимальное ингибирование 47 ± 4 %, n_H = 1,6 ± 0,5 (n = 5). (Е) Концентрационная зависимость ингибирования CBD-вызванного притока кальция (15 мкМ) после 5-минутной прединкубации с DDA. IC_{50} = 7,0 ± 1,0 нМ, максимальное ингибирование 78,0 ± 2,6 %, n_H = 1,10 ± 0,16 (n = 5). (Ж) Концентрационные зависимости CBD-вызванного притока кальция в отсутствии DDA и при совместном нанесении с 5 нМ DDA. Отношение EC_{50} = 2,7 ± 0,6 (n = 5).

На первом этапе мы оценили влияние DDA на вход кальция, индуцированный 2-APB. Кальциевый имиджинг показал, что совместное нанесение DDA и 2-APB не вызывало значимого эффекта (Рисунок 11 А, Б). Однако после пятиминутной прединкубации DDA ингибировал приток кальция, вызванный 2-APB, со значением полумаксимального ингибирования (IC_{50}) 0,87 ± 0,18 мкМ, коэффициентом Хилла (n_H) 1,6 ± 0,5 и эффективностью 47 ± 4 % (Рисунок 11, Д). Эти показатели коррелируют с диапазоном значений, полученных ранее методом локальной фиксации потенциала, приведенными в предыдущем разделе.

Далее мы использовали каннабидиол (CBD), каннабиноид растительного происхождения. который активирует TRPV3 [46]. В условиях кальциевого имиджинга EC_{50} для CBD составило 12,8 ± 1.6 μM, что немного выше значения, полученного ранее для крысиного ортолога TRPV3, экспрессированного в HEK-293 (EC_{50} 3,7 ± 1,6 μM, среднее ± стандартное отклонение) [46]. При этом, CBD в концентрации 100 мкМ не вызывал характерного притока кальция в нетрансфицированных клетках CHO-TR (Рисунок 11 Г).

Согласно нашим наблюдениям, DDA ингибировал CBD-вызванный приток кальция в ответ и на совместное нанесение двух веществ, и после прединкубации с DDA (Рисунок 11 В, Е, Ж). Для надлежащего сравнения с 2-APB мы количественно рассмотрели ингибирование CBD-вызванной активации после пятиминутной прединкубации с DDA (Рисунок 171 Е). Удивительно, но полученные значения IC_{50} (7,0 ± 1,0 нМ), nH (1,10 ±

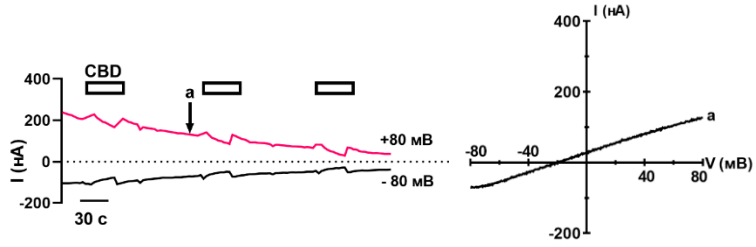
0,16) и эффективности (78,0 ± 2,6 %) раскрыли значительно большую активность DDA по отношению к CBD-вызванному притоку кальция, превосходящую активность против 2-APB.

Чрезвычайно низкая IC_{50} и коэффициент Хилла близкий к 1 позволили нам предположить, что DDA и CBD могут взаимодействовать конкурентно. Для анализа конкурентного обратимого антагонизма классически используется метод Шилда, однако он требует высоких концентраций агониста, которые невозможно было достичь из-за плохой растворимости CBD в водных растворах. Принимая во внимание это ограничение, мы смогли получить кривую активации CBD при совместном нанесении с 5 нМ DDA и сравнить ее с кривой в отсутствии ингибитора (Рисунок 11 Ж). При более высоких концентрациях DDA кривые активации не достигали насыщения, поэтому не использовались для анализа. Кривая в присутствии 5 нМ DDA была сдвинута вправо без изменения наклона (n_H 0,97 ± 0,14 без DDA и 0,94 ± 0,15 в присутствии 5 нМ DDA, p = 0.9123), что свидетельствует в пользу конкурентного механизма. Хотя одной концентрации ингибитора недостаточно для полноценного анализа по Шилду, из имеющихся экспериментальных данных мы рассчитали приблизительную величину равновесной константы комплекса DDA-TRPV3, pK_B, использовав уравнение Гаддума-Шилда. Полученная pK_B была равна 8,53 ± 0,15. Альтернативно, равновесная константа (Ki) может быть рассчитана из концентрационной зависимости ингибирования с использованием уравнения Ченга-Прусоффа, которое также предполагает конкурентный механизм. С этим подходом мы получили pKi равное 8,52 ± 0,07. Высокое соответствие между двумя значениями констант, полученными из независимых наборов данных, явным образом указывает на обратимый конкурентный механизм. Значения IC_{50} 7 нМ для CBD-вызванной активации и 0,87 мкМ для 2-APB-вызванной активации ставят DDA в ряд с наиболее активными ингибиторами TRPV3 из известных. Таким образом, DDA является высокоаффинным ингибитором CBD-вызванной активации TRPV3 с вероятным конкурентным действием.

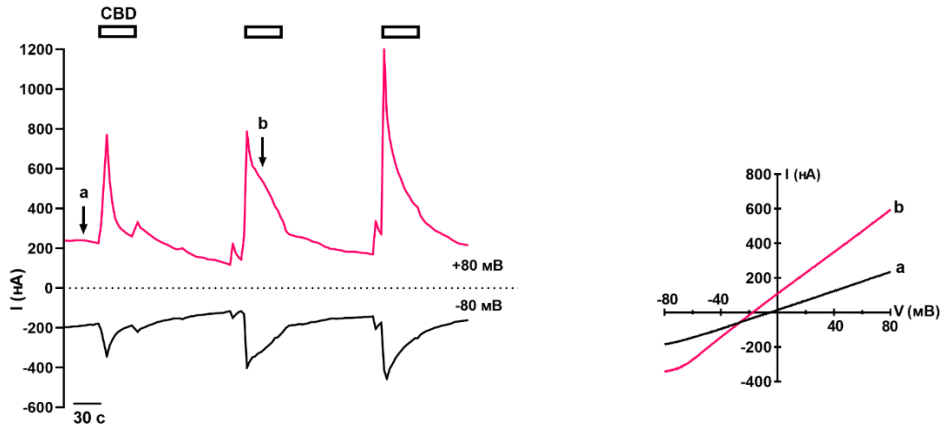
3.2.5 Действие DDA на токи в ооцитах лягушки, экспрессирующих TRPV3

Для подкрепления результатов, полученных в кальциевом имиджинге, мы протестировали ингибирующий эффект DDA на токи в ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих TRPV3, записанных с помощью двухэлектродной фиксации потенциала [38,175,176].

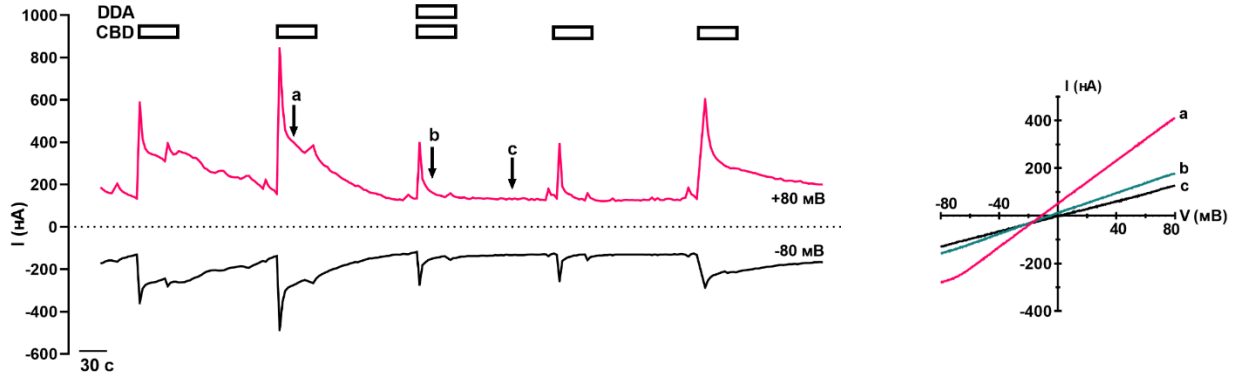
А


CBD
a
+80 мВ
- 80 мВ
I (нА)
30 с
I (нА)
V (мВ)
a

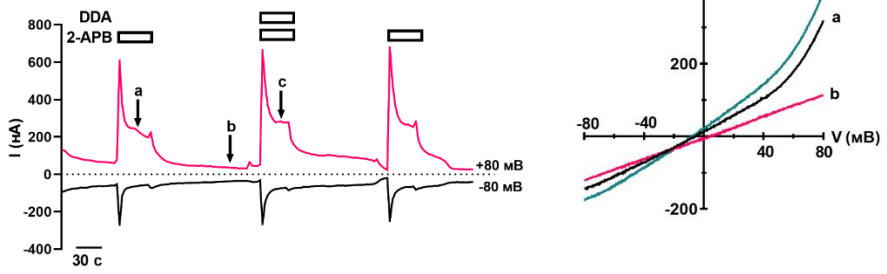
Б


CBD
a
b
+80 мВ
-80 мВ
I (нА)
30 с
I (нА)
V (мВ)
a
b

В


DDA
CBD
a
b
c
+80 мВ
-80 мВ
I (нА)
30 с
I (нА)
V (мВ)
a
b
c

Г


DDA
2-APB
a
b
c
+80 мВ
-80 мВ
I (нА)
30 с
I (нА)
V (мВ)
c
a
b

Д

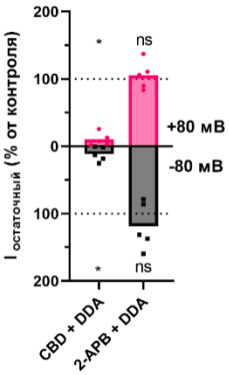

I остаточный (% от контроля)
ns
ns
+80 мВ
-80 мВ
CBD + DDA
2-APB + DDA

Рисунок 12. Ингибирующее действие DDA на токи в ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих TRPV3. (А-Б) Слева, амплитуды токов от неинъецированных ооцитов (А) или от TRPV3-экспрессирующих ооцитов (Б) в ответ на 50 мкМ каннабидиола (CBD). Справа, записи токов в ответ на рэмп потенциала от −80 до +80 мВ в точки времени, обозначенные буквами слева. (В) Слева, репрезентативные амплитуды токов, вызванные 50 мкМ CBD до, во время и после (отмывка) совместного нанесения с 2 мкМ DDA. Справа, записи токов в ответ на рэмп потенциала от −80 до +80 мВ в точки времени, обозначенные буквами слева. (Г) Слева, репрезентативные амплитуды токов, вызванные 500 мкМ 2-APB до, во время и после (отмывка) совместного нанесения с 10 мкМ DDA. Справа, соответствующие записи токов. (Д) Столбчатая диаграмма эффектов DDA на амплитуды CBD- и 2-APB-вызванных токов при −80 и +80 мВ (n = 5 ооцитов). Контроль – неингибированный ответ. Тест Вилкоксона для парных зависимых выборок, * $p < 0.05$, ns $p > 0.05$.

Последовательные нанесения CBD на пустые (неинъецированные) ооциты не вызывало никаких токов. Нанесение 50 мкМ CBD на ооциты, инъецированные мРНК TRPV3, вызывало токи с обратным выпрямлением и медленной отмывкой активатора (Рисунок 12). Последовательные нанесения CBD не вызывали десенситизацию (run-down) токов, а скорее демонстрировали небольшое увеличение амплитуд, что вероятно связано с сенситизацией TRPV3 при повторных стимулах. В ответ на совместное нанесение CBD и DDA амплитуды токов значительно подавлялись. Эффект не зависел от мембранного потенциала. При последующем нанесении только CBD отмывка ингибирования не наблюдалась. При втором нанесении CBD ток в некоторой степени восстанавливался (Рисунок 12). В отличие от этого, DDA не оказывал эффекта на 2-APB-вызванные токи при совместном нанесении. остаточный ток при +80 мВ составлял 10 ± 4 % для CBD + DDA и 105 ± 9 для 2-APB + DDA, а при −80 мВ 12 ± 5 % для CBD + DDA и 118 ± 16 % для 2-APB + DDA (Рисунок 12). Таким образом, DDA ингибирует CBD-вызванную активацию быстрее и с большей активностью, чем активацию, вызванную 2-APB.

Стоит отметить, что в пэтч-кламп экспериментах DDA ингибировал токи в совместном нанесении с 2-APB. Мы связываем это расхождение с особенностями методик. Кинетика TRPV3 модулируется кальцием и магнием с внутри- и внеклеточной стороны [31,89], внутриклеточным кальмодулином [31], полиаминами [177] и другими факторами. В пэтч-кламп экспериментах внутриклеточный раствор содержал хелатор кальция, а внеклеточный раствор был номинально бескальциевым. Также, записи от целой клетки предполагают неизбежный диализ внутриклеточных компонентов. Мы проводили

записи на ооцитах и Fluo-4 имиджинг при стандартных 1,26-1,8 мМ кальция в омывающих растворах, а внутриклеточные компоненты интактны в этих методиках, что возможно объясняет, почему DDA действует на токи, вызванные 2-APB с разной кинетикой, но с одинаковой активностью и эффективностью (IC_{50}).

3.3 Тепловая активация TRPV3

3.3.1 Сравнительная кинетика активации TRPV1 и TRPV3 под действием тепла

Согласно современным представлениям, главной физиологической функцией термо-TRP каналов (в том числе, TRPV3) является детекция температуры. В связи с этим, особенно интересным является тестирование ингибиторов канала против теплового стимула.

Классически, тепловая активация TRPV1 и TRPV3 изучалась с помощью записей токов от целых клеток или одиночных каналов на изолированных участках мембраны («пэтчах»). С помощью этого подхода возможно напрямую измерять проводимость и вероятность открытого состояния, однако недостатками метода являются трудоемкость и низкая стабильность гигаомного контакта при нагревании. В этой работе, мы подробно рассмотрели альтернативный подход с использованием платформы для ПЦР в реальном времени и Fluo-4 анализа притока кальция. Ранее системы для ПЦР в реальном времени уже использовались для изучения мутантных изоформ TRPV1 [178] и тестирования лигандов TRPV1, TRPA1, TRPM8 [179]. Об изучении активации TRPV3 в подобных системах ранее не сообщалось. Другой новацией нашего подхода является ступенчатый протокол нагрева, который позволил наблюдать динамический процесс накопления внутриклеточного кальция под действием тепла. Системы для ПЦР в реальном времени, в целом, предоставляют несколько существенных преимуществ: высокоточную систему нагрева, которая совмещена с параллельной флуоресцентной детекцией (флуометрией), а также гибкий, масштабируемый 96-луночный формат. Для валидации метода мы рассмотрели активацию rTRPV1-CHO и hTRPV3-CHO. Температурные протоколы состояли из 30-секундных ступенек нагрева от 25 ºC до 55 ºC с инкрементом в 2,5 ºC для rTRPV1-CHO и до 45 ºC с инкрементом в 2 ºC для hTRPV3-CHO (Рисунок 13). В этих условиях под действием тепла в обеих исследуемых линиях наблюдался приток кальция, который достигал насыщения при повышенных температурах. Записи, приведенные на Рисунок 13, показаны в виде прироста сигнала от TRPV-экспрессирующих клеток над сигналом от не трансфицированных генами каналов (пустых) клеток CHO-TR. Прирост сигнала Fluo-4 в TRPV-CHO полностью ингибировался в присутствии ингибиторов каналов: 50 μM капсазепина для TRPV1, 20 μM рутениевого красного для TRPV3. Стоит отметить, что для 50 μM капсазепина наблюдалась нелинейность сигнала. Понижение базовой флуоресценции может быть обусловлено блокадой конститутивной активности TRPV1 или неспецифическими эффектами ингибитора на депо-управляемый вход

кальция, а последующий прирост – частичным преодолением ингибирования. При этом, несмотря на смещение базовой линии, записи наглядно демонстрируют эффективное понижение притока кальция в rTRPV1-CHO над уровнем пустых клеток. Таким образом, можно утверждать, что вызванный тепловой стимуляцией сигнал от rTRPV1-CHO и hTRPV3-CHO опосредован активацией TRPV1 и TRPV3, соответственно.

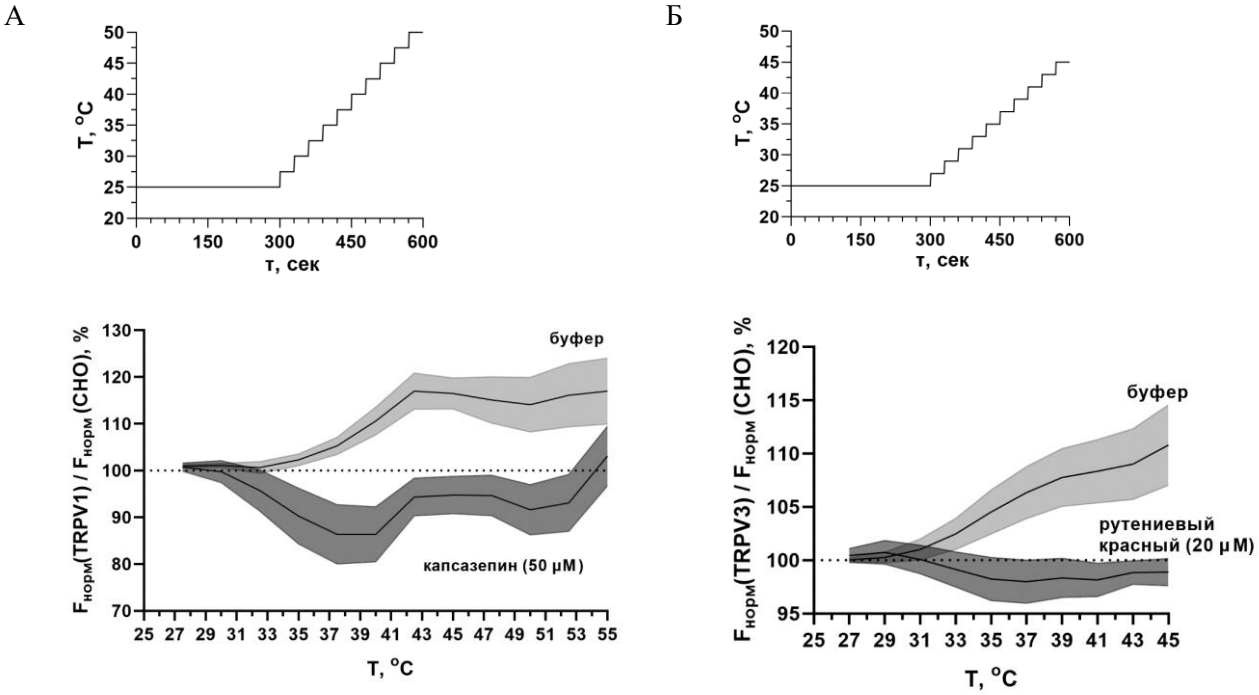


Рисунок 13. Протоколы нагрева и усредненные записи нормализованных кальциевых сигналов от rTRPV1-CHO (А) и hTRPV3-CHO (Б) в присутствии буфера или соответствующих ингибиторов. Ступеньки нагрева начинались после пятиминутной инкубации в термоциклере при 25 ºС. Окрашенные области показывают стандартную ошибку среднего, сплошные черные линии – средние значения. Записи усреднены от 4 (rTRPV1-CHO) и 6 (hTRPV3-CHO) независимых экспериментов.

Стоит отметить, что Fluo-4 тест (а также Fura-2 тест) является практически незаменимым методом исследования TRP каналов, что отражено в огромном массиве исследований. Однако его существенной особенностью является то, что тест не позволяет измерять ионный ток, а регистрирует концентрацию свободного цитоплазматического кальция. Эта концентрация является результатом нескольких динамических процессов: входа кальция через TRPV каналы, вымывания кальция из цитоплазмы насосами, а также кальций-зависимым выбросом кальция из эндоплазматического ретикулума. В целом, вклад входа кальция через TRPV при гетерологичной гиперэкспресии каналов очень велик в сравнении с другими факторами. Таким образом, принимая тот факт, что наблюдаемые

кальциевые сигналы являются лишь косвенной мерой открытого состояния TRPV каналов, мы рассчитали приблизительные вероятности открытого состояния (P_0) из значений флуоресценции. Далее, для анализа кинетики активации мы аппроксимировали зависимости P_o от температуры (T) сигмоидальной функцией Больцмана. Результаты представлены на Рисунок 14 и в Таблица 7.

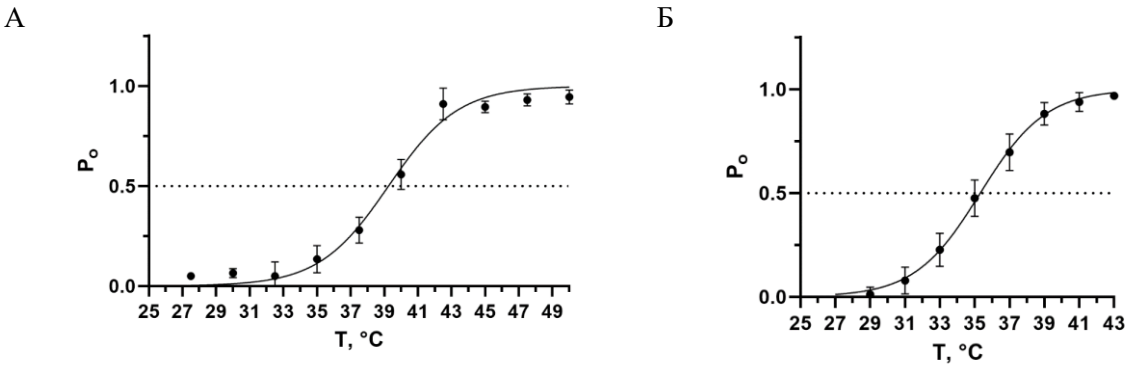


Рисунок 14. Зависимости вероятности открытого состояния каналов Po от температуры для TRPV1 (А) и TRPV3 (Б), аппроксимированные функцией Больцмана.

Таблица 7. Параметры тепловой активации TRPV1 и TRPV3. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего, n – количество независимых экспериментов.

Параметр	**Обозначение [ед. изм.]**	**TRPV1 (n = 4)**	**TRPV3 (n = 6)**
Температура полумаксимальной активации	$T_{1/2}$ [ºC]	39,25 ± 0,31	35,32 ± 0,27
Наклон кривой Больцмана	k [ºC]	2,07 ± 0,27	1,88 ± 0,24
Изменение энтальпии	ΔH [ккал/моль]	90 ± 13	103 ± 16
Изменение энтропии	ΔS [кал/(моль*К)]	289 ± 43	334 ± 51
Температурный коэффициент	Q_{10}	~10 (32,5-40 ºC)	~20 (31-39 ºC)

Согласно полученным данным, TRPV1 обладает более высоким порогом активации по сравнению с TRPV3 (температура полумаксимальной активации $T_{1/2}$ для TRPV1 39,25 ± 0,31 °C, для TRPV3 35,32 ± 0,27 °C). Крутизна кривых активации (параметр k) была сопоставима для обоих типов каналов, составив 2,07 ± 0,27 для TRPV1 и 1,88 ± 0,24 для TRPV3, что свидетельствует о высокой кооперативности процесса активации в обоих случаях. Приблизительные значения Q_{10} в диапазонах крутого роста активационных

кривых имели значения ~10 для TRPV1 и ~20 для TRPV3 (для сравнения: для большинства ионных каналов Q_{10} = 1-3 [19]). Высокая кооперативность перехода в открытое состояние (k) и высокая температурная чувствительность (Q_{10}) согласуются с физиологической ролью TRPV1 и TRPV3 в качестве термосенсоров. Также, наблюдаемые нами кинетические параметры активации согласуются с известными классическими значениями, полученными с помощью записей токов одиночных каналов: Q_{10} 14-26 для TRPV1 [26,180,181]; 21-65 для TRPV3 [1,9,32]. Рабочие температуры для TRPV3 хорошо укладываются в диапазон, известный из литературных данных (31-39 ºC [2,3,9,28]). В то же время, температурный порог TRPV1 был несколько занижен (37-42 °C [24,27,28,182,183]), что, возможно, связано с особенностями методики. Классические параметры для TRPV1 были получены при помощи записей токов от целых клеток или одиночных каналов, что позволяет рассматривать работу белка в изолированном состоянии. В отдельных исследованиях указывалось на то, что в мультиканальных пэтчах активность TRPV1 наблюдалась при температурах ниже 40 ºC [184]. Кроме того, флуоресцентный кальциевый анализ от массы интактных клеток может демонстрировать заниженные температуры активации TRPV1 за счет активной клеточной регуляции. В частности, в работе, где использовался кальциевый имиджинг и нагрев инфракрасным лазером, активация TRPV1 наблюдалась при стимуляции температурой 39 ºC [185]. Фосфорилирование протеинкиназами A и C понижает температурный порог TRPV1 [186]. Также, в отличие от метода локальной фиксации потенциала, в нашей системе контроль за мембранным потенциалом невозможен. Поскольку мы проводили измерения в клеточной суспензии, потенциал мембраны мог быть деполяризован. Ранее было показано, что деполяризация мембранного потенциала снижает температурный порог активации TRPV1 и вызывает активацию каналов при температуре ниже 40 ºC [182].

3.3.2 Сравнительная термодинамика активации TRPV1 и TRPV3 под действием тепла

Температурная активация термо-TRP каналов обладает уникальными в сравнении с другими белками термодинамическими параметрами, поэтому далее мы рассчитали их, используя наши данные. Для этого мы построили зависимости ln(Keq) от 1000/T (графики Вант-Гоффа) (Рисунок 15) и провели линейную аппроксимацию в температурном диапазоне, где наблюдался крутой рост активационных кривых. Полученные изменения энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) при переходе каналов в открытое состояние хорошо согласуются с результатами предыдущих исследований TRPV1 и TRPV3: для TRPV1 ΔH

активации 70-150 ккал/моль и ΔS 200-470 кал/(моль*К) [24,25,182,183], а для TRPV3 ΔH 54-91 ккал/моль, ΔS = 287 кал/(моль*К) [1,9].

Таким образом, кинетические и термодинамические параметры активации TRPV1 и TRPV3, полученные в нашей системе, показали общее соответствие литературным значениям. Это подтверждает применимость подхода с использованием термоциклера для ПЦР в реальном времени для изучения термо-TRP каналов.

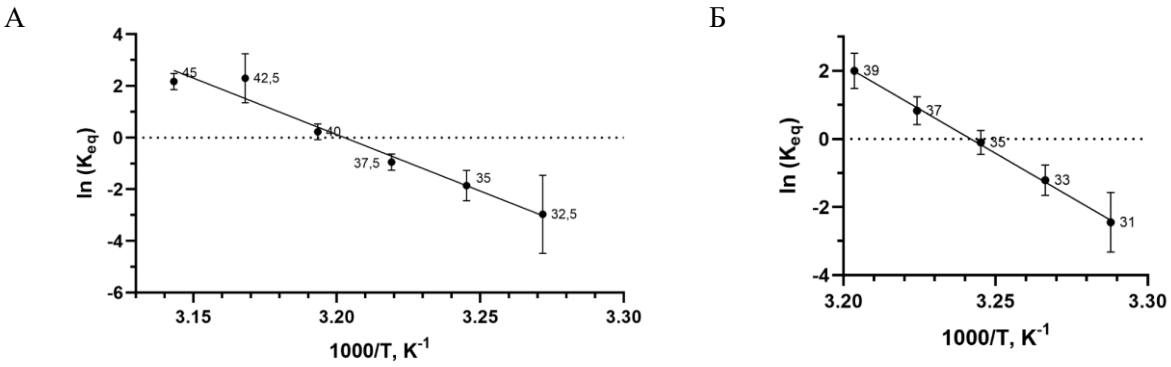


Рисунок 15. Графики Вант-Гоффа, использованные для расчета изменения энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) при тепловой активации TRPV1 (А) и TRPV3 (Б).

3.3.3 Действие DDA на тепловую активацию TRPV3

Далее мы протестировали действие DDA на hTRPV3-CHO в условиях тепловой активации. Прединкубация с 1 или 10 мкМ DDA, в отличие от лунок с 20 мкМ RR, не показала никаких отличий кальциевого сигнала от контрольной группы (буфер) (Рисунок 16). Кажущийся порог активации и наклон не показали значительных отличий. Пиковые интенсивности флуоресценции в группах с добавлением DDA при 41 ºС также не показали статистически значимых отличий от контрольной группы. Таким образом, DDA не действует на тепловую активацию TRPV3.

А Б

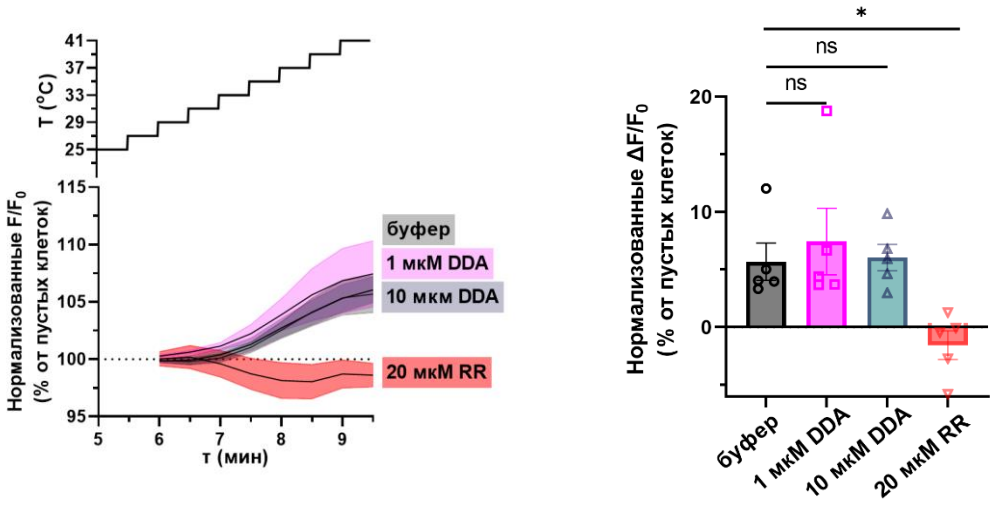


Рисунок 16. DDA не оказывает эффекта на тепловую активацию hTRPV3-CHO. (А) Сверху, ступенчатый температурный протокол, использованный в эксперименте. Нагрев начинался после пятиминутного кондиционирования при 25 ºC. Снизу, усредненные записи нормализованной флуоресценции от hTRPV3-CHO, преинкубированных с HBSS (буфер), 1 мкМ, 10 мкМ DDA или 20 мкМ рутениевого красного (RR). Закрашенные области показывают погрешность (стандартную ошибку среднего), черные линии посередине – средние значения. Записи усреднены от 5 независимых биологических повторов. (Б) Столбчатая диаграмма эффектов DDA и RR на тепловую стимуляцию hTRPV3-CHO при 41 ºC (n = 5 независимых биологических повторов). Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим множественным сравнением по критерию Даннетта; * $p < 0,05$, ns $p > 0,05$.

3.4 Молекулярный механизм действия DDA на TRV3

3.4.1 Структурное взаимодействие CBD и TRPV3

Структурный механизм действия CBD на TRPV3 ранее не изучался подробно, однако, согласно данным, приведенным в предыдущем разделе, он непосредственно связан с механизмом действия DDA. Поэтому сначала мы рассмотрели структурное взаимодействие CBD с каналом.

Ранее опубликованная криоэлектронная структура человеческого TRPV3 в комплексе с природным каннабиноидом тетрагидроканнабиварином (THCV), который действует как активатор, показала, что THCV связывается в ванилоидном кармане, вызывая открытие поры канала [10]. Ванилоидный карман (сайт) представляет собой особый участок в трансмембранной области TRPV каналов, который образован полостью между α-спиралями S3 и S4, а также линкером S4-S5 одной субъединицы и областью S5-S6 соседней субъединицы [13]. THCV и CBD обладают сходными химическими структурами и способностью активировать TRPV3 (см. Таблица 1), что позволяет предположить, что они, вероятно, имеют общий сайт связывания с каналом. Чтобы проверить эту гипотезу, мы построили модель комплекса, используя молекулярный докинг. Докинг проводился в два этапа: сначала проводился поиск сайта связывания CBD по всему каналу (“слепой докинг”), затем в предполагаемом кармане оптимизировалась поза лиганда. В результате был получен набор конформаций для CBD в комплексе с ванилоидным сайтом (Таблица 8.).

Таблица 8. Результаты докинга для предполагаемых комплексов CBD и TRPV3 (PDB: 8V6L, десять лучших решений). Программное обеспечение: Rosetta 3. Звездочками отмечены модели, в которых CBD имел позу сходную с THCV в структуре 8V6L.

№ модели	interface delta ligand	total score	Transform accept ratio
1	-8,34	-1959,967	0,682
2	-8,125	-1955,723	0,746
3*	-8,028	-1963,814	0,64
4	-7,973	-1949,162	0,682
5*	-7,696	-1973,43	0,746
6	-7,644	-1962,191	0,566
7	-7,546	-1956,472	0,62
8*	-7,477	-1962,193	0,732
9*	-7,463	-1960,434	0,652
10	-7,408	-1962,51	0,67

Визуальная оценка десятки лучших решений с самой низкой энергией дала понять, что конформация CBD, похожая на конформацию THCV в криоэлектронной структуре, является наиболее представленной моделью. В этом положении CBD занимает полость на границе раздела между S1-S4 и поровым доменами, находясь между S3 и S4 одной субъединицы и S6 соседней субъединицы (Рисунок 17).

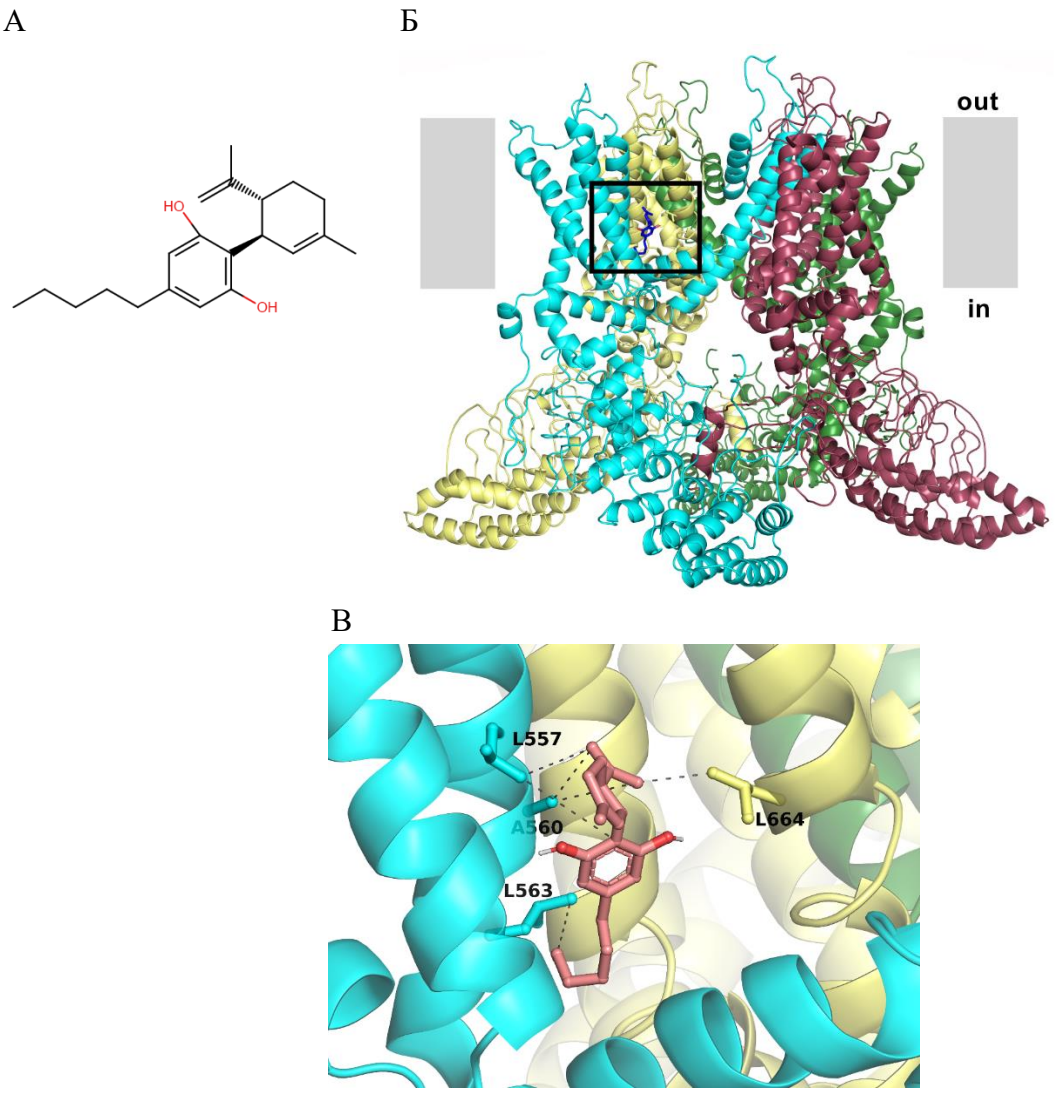


Рисунок 17. Взаимодействие CBD с TRPV3 по данным молекулярного докинга. (А) Структура CBD. (Б) Модель комплекса человеческого TRPV3 в открытой конформации (PDB 8V6L) с CBD в ванилоидном сайте. (В) Крупный план ванилоидного кармана, связанного с CBD. Гидрофобные взаимодействия показаны пунктирными линиями.

Чтобы проверить полученную докинг-модель, мы мутировали остатки в S4 (L557A, A560L, L563A) и L664S в S6-спирали. Мутантные каналы были экспрессированы в CHO и протестированы с помощью Fluo-4 имиджинга. Активация L557A, A560L и L563A была

проверена с помощью 2-APB в другом исследовании, где было показано, что эти замены оказывают минимальное влияние на соответствующие EC_{50}; следовательно, мембранная презентация и функциональность мутантов не нарушена [10]. В этой работе мы также валидировали L664S с помощью 2-APB и показали, что активность 2-APB для L664S не отличалась значительно от каналов дикого типа (wt, EC_{50} 82 ± 7 мкМ, n_H 2.7 ± 0.6, эффективность 100 ± 7 % (n = 4); L664S, EC_{50} 100 ± 6 мкМ, n_H 1.28 ± 0.10, эффективность 65 ± 2% (n = 3)). Далее мы протестировали CBD на мутантных каналах (Рисунок 18, Таблица 9). В сравнении с диким типом, замена A560L вызвала сдвиг активационной кривой CBD вправо без кажущегося насыщения (EC_{50} > 100 мкМ). Хотя ответ на 100 мкМ CBD был значителен, отсутствие насыщения и кажущаяся EC_{50}, превышающая 100 мкМ, указывают на существенное нарушение связывания CBD. Замена L664S, напротив, вызвала сдвиг кривой влево, с практически десятикратным уменьшением EC_{50} в сравнении с диким типом.

Как показано ранее [10], L557A заметно уменьшает EC_{50} для THCV, не влияя на эффективность, что согласуется с позой THCV в криоэлектронной структуре. При этом, влияние A560L не было выраженным. В наших функциональных тестах A560L, напротив, показал значительное влияние на связывание CBD. Согласно данным моделирования, A560 предположительно реализует гидрофобные взаимодействия с остовом CBD, за счет чего происходит стабилизация комплекса. Замена аланина с короткой боковой цепью на более объемный лейцин потенциально способно создавать стерическое препятствие для связывания CBD. L664 также способен вносить вклад в гидрофобное окружение кармана связывания. Увеличение активности CBD для L664S вероятно происходит за счет формирования дополнительной водородной связи между S664 и гидроксильной группой фенольного кольца CBD. Таким образом, результаты мутагенеза подтверждают предсказания докинг-модели, согласно которой взаимодействие CBD и TRPV3 происходит в ванилоидном сайте.

Таблица 9. Параметры активации CBD для каналов дикого типа (wt) и мутантных каналов. Эффективности рассчитаны как максимальный ответ на CBD, нормализованный ответ при насыщающей концентрации 2-APB (500 мкМ). Н/п – неприменимо.

	EC_{50}, мкМ	**n_H**	**Эффективность, % от 500 мкМ 2-APB**
wt	12.8 ± 1.6	0.94 ± 0.11	32 ± 5
L557A	15.8 ± 1.7	2.0 ± 0.4	55 ± 9
A560L	> 100	н/п	н/п
L563A	24.4 ± 2.7	2.5 ± 0.6	49 ± 7
L664S	1.36 ± 0.23	3.2 ± 2.5	22 ± 4

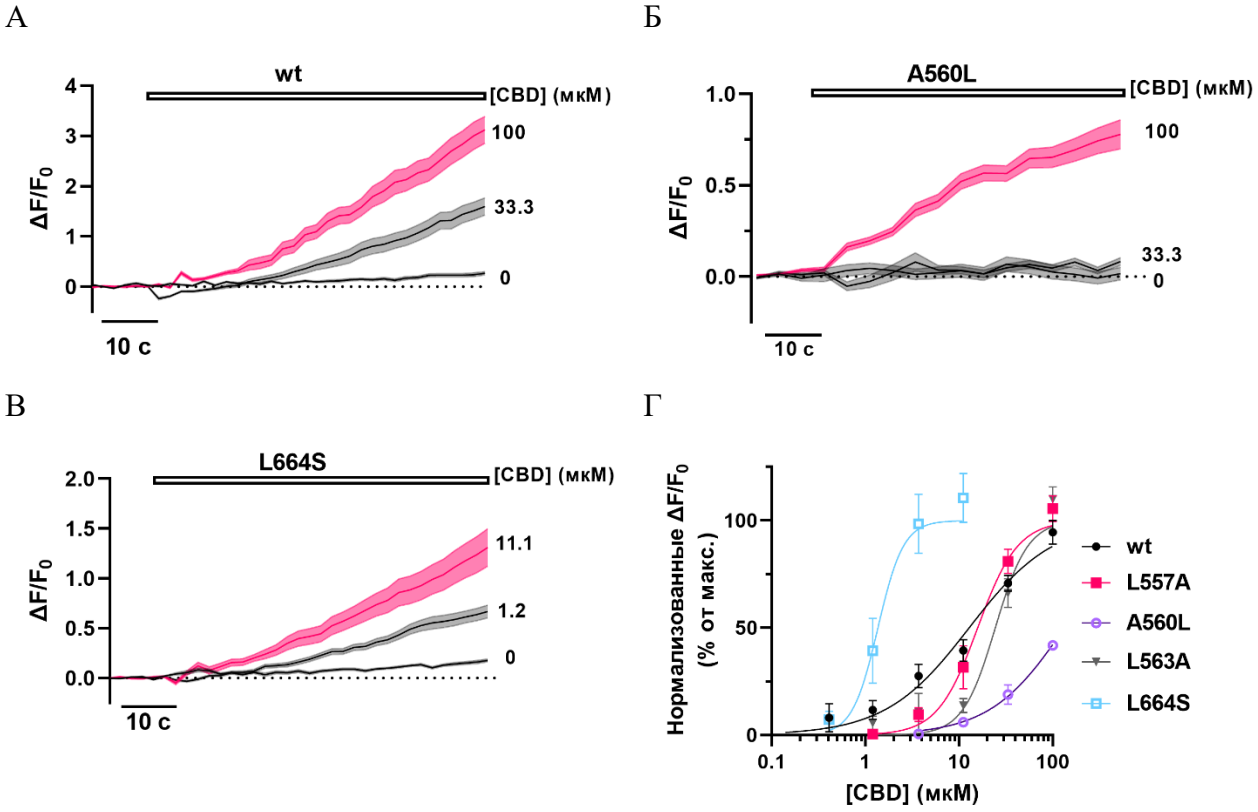


Рисунок 18. Взаимодействие CBD с TRPV3 по данным мутагенеза канала. (А-В) Репрезентативные записи притока кальция в ответ на CBD в CHO, экспрессирующих TRPV3 дикого типа (wt) (А) или с заменами A560L (Б), L664S (В). Записи представляют собой усредненные значения от 20-40 клеток. Окрашенные области показывают стандартную ошибку, черные линии посередине – средние значения. (Г) Концентрационные зависимости CBD-вызванной активации каналов дикого типа и мутантных каналов (n = 5 независимых биологических повторов).

3.4.2 Структурное взаимодействие DDA и TRPV3

Далее мы использовали молекулярный докинг для поиска сайта DDA. Поиск по целому белку с последующей оптимизацией позы позволил получить модель TRPV3 в закрытом состоянии, где DDA связывается в ванилоидном кармане. Среди предполагаемых комплексов выделялись три группы решений, в которых позы DDA практически полностью накладывались друг на друга и имели незначительные вариации в ориентации γ-лактонного кольца лиганда (Таблица 10). В самой представленной ориентации (Рисунок 19) DDA обращен γ-лактонным кольцом к внеклетоному направлению и бициклической частью к внутриклеточному направлению и зажат между S4 и S6 сегментами канала. В этой модели предполагаемые взаимодействия преимущественно гидрофобные (алкил-алкил и π-алкил).

Таблица 10. Результаты докинга для предполагаемых комплексов DDA и TRPV3 (PDB: 8V6K, десять лучших решений). Программное обеспечение: Rosetta 3.

№ модели	**interface delta ligand**	**total score**	**Transform accept ratio**	**поза лиганда**
1	-10,806	-4895,313	0,702	I
2	-8,589	-4892,316	0,51	II
3	-8,483	-4898,473	0,744	II
4	-8,473	-4895,668	0,618	III
5	-8,405	-4897,71	0,596	III
6	-8,386	-4894,358	0,766	III
7	-8,333	-4891,565	0,662	III
8	-8,332	-4892,652	0,688	III
9	-8,259	-4890,898	0,618	III
10	-8,254	-4893,412	0,608	III

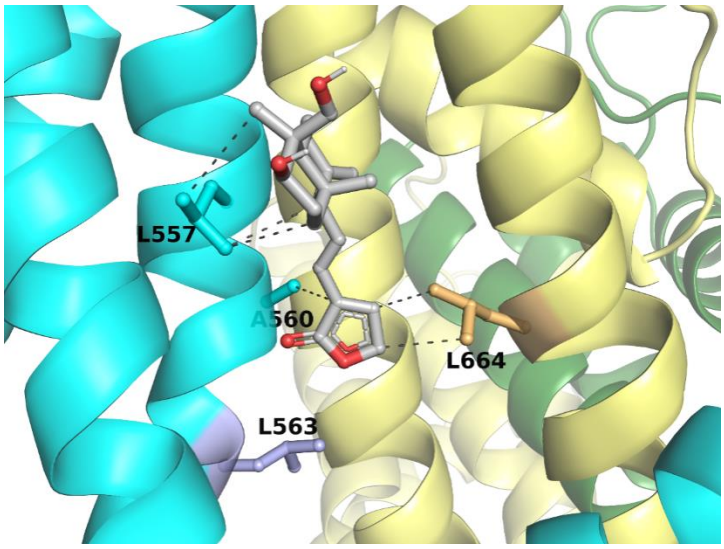


Рисунок 19. Докинг-модель предполагаемого комплекса TRPV3 в закрытом состоянии (PDB 8V6K) с DDA. Гидрофобные взаимодействия с соседними остатками показаны пунктирными линиями.

Чтобы подтвердить модель связывания DDA, мы использовали кальциевый имиджинг и 2-APB в качестве арбитражного активатора на каналах с мутациями в S4 и S6: L557A, A560L, L563A и L664S. Для всех мутантов DDA прединкубировался пять минут перед добавлением 2-APB. Мы обнаружили, что замены L557A и L664S полностью отменяли ингибирование 2-APB-вызванного притока кальция, а A560L и L563A не показали значительных отличий от дикого типа (Рисунок 20, Таблица 11). Эти результаты согласуются с основной докинг-моделью, согласно которой боковые цепи двух остатков лейцина (L557 и L664) стабилизируют посредством гидрофобных взаимодействий бициклическую часть DDA и γ-лактонное кольцо. Таким образом, мы идентифицировали мутации, которые делают TRPV3 нечувствительным к DDA. Это подтверждает предположение о том, что DDA действительно связывается в ванилоидном кармане канала и что этот сайт опосредует ингибирующее действие DDA на TRPV3.

Таблица 11. Параметры ингибирования каналов TRPV3 дикого типа (wt) и мутантных каналов по данным на Рисунок 20. Н/п – неприменимо.

	IC_{50}, мкМ	**n_H**	**Эффективность, %**
wt	0.87 ± 0.18	1.6 ± 0.5	47 ± 4
L557A	>10	н/п	н/п
A560L	0.76 ± 0.16	2.8 ± 1.2	43 ± 4
L563A	0.77 ± 0.20	2.0 ± 0.8	50 ± 5
L664S	>10	н/п	н/п

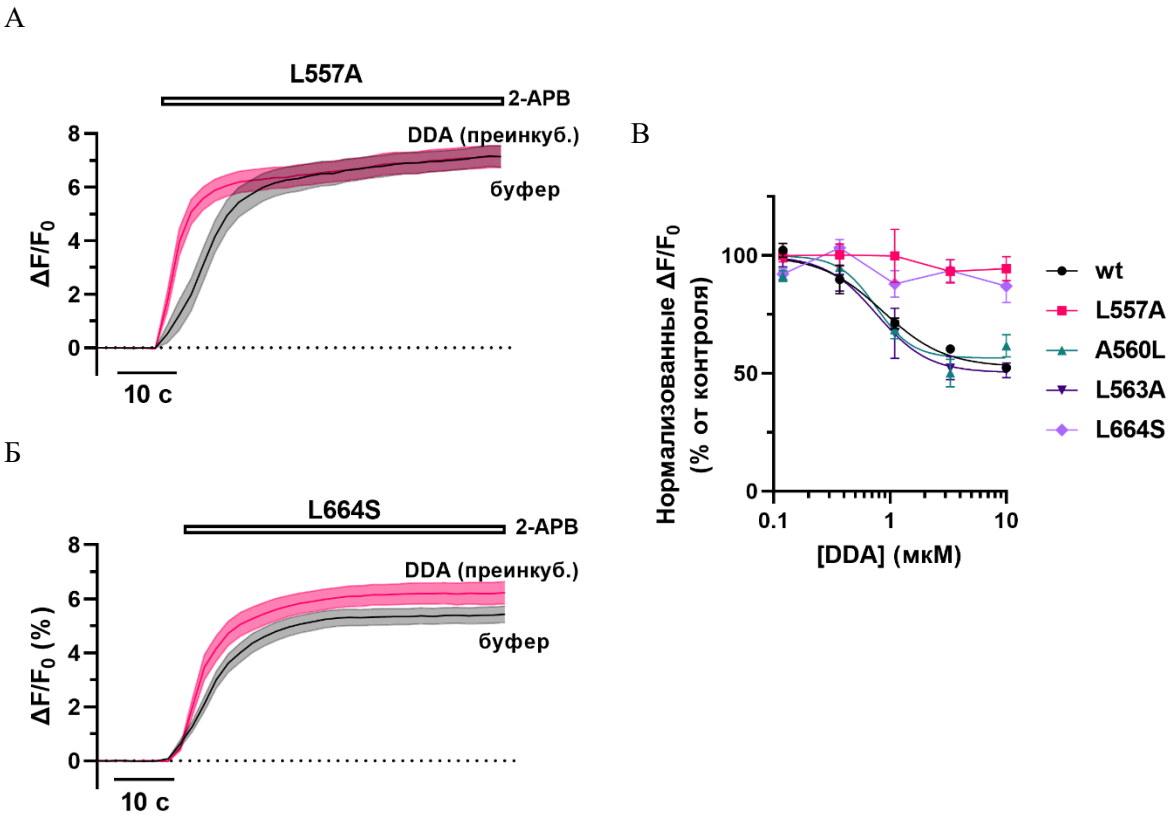


Рисунок 20. Взаимодействие DDA с TRPV3 по данным мутагенеза канала. (А-Б) Репрезентативные записи притока кальция, вызванного 100 мкМ 2-APB, после 5-минутной прединкубации с клетками CHO, экспрессирующими TRPV3 дикого типа (wt) и мутантные TRPV3. Записи представляют собой усредненные значения от 20-30 клеток. Окрашенные области показывают стандартную ошибку, черные линии посередине – средние значения. (В) Концентрационные зависимости ингибирования 2-APB-вызванного притока кальция после пятиминутной прединкубации с DDA CHO, экспрессирующих TRPV3 дикого типа (wt) и мутантных каналов (n = 5 независимых биологических повторов для L557A, A560L, L563A, n = 6 для L664S). Контроль – неингибированный приток кальция, вызванный 2-APB.

Таким образом, мы идентифицировали остатки в ванилоидном кармане, которые вносят ключевой вклад в связывание CBD (A560, L664) и DDA (L557, L664). Из известных данных криоэлектронной микроскопии известно, что ванилоидный сайт TRPV3 может принимать различные активаторы и ингибиторы, обладающие различной активностью. Например, связывание высокоактивного синтетического ингибитора трпвицина происходит в ванилоидном сайте человеческого TRPV3 при основном участии со стороны остатков A556, A560 и F601 [68]. Также было показано, что ванилоидный сайт

способен принимать ациклические монотерпены, слабые активаторы TRPV3, либо по одному лиганду на сайт для цитронеллаля, цитраля и линалоола, которые главным образом взаимодействуют с L563 и L664, либо по два лиганда на сайт для изодигидролавандулаля, который связывается с соседними верхним и нижним участками [85]. Вкупе с этими данными, наши результаты подчеркивают конформационную пластичность ванилоидного кармана – когда различные остатки одного белкового кармана опосредуют разные ориентации связывания и функциональный результат (открытое/закрытое состояние).

3.4.3 Модальная селективность действия DDA

В свете структурных и функциональных данных, полученных в этой диссертации, можно сделать вывод о том, что DDA действует как модально-селективный ингибитор канала TRPV3, т.е. его эффект зависит от типа активирующего стимула.

DDA действует как конкурентный обратимый антагонист против активации CBD, напрямую препятствуя связыванию активатора. В отличие от этого, для 2-APB DDA действует как негативный аллостерический модулятор с частичным ≈50-процентным эффектом. При этом, DDA неактивен в случае тепловой активации. Такая специфичность к активирующему стимулу указывает на независимые пути активации канала под действием CBD, 2-APB и тепла. Три типологически различных стимула используют разные энергетические пути внутри канала за счет модульного устройства воротного механизма TRPV3. Этот принцип согласуется с современным пониманием структуры и функции канала. В апо-состоянии ванилоидный карман занят фосфолипидом, который выталкивается наружу при тепловой активации, что делает возможными конформационные изменения, приводящие к открытию поры канала [9,10]. Липидоподобные активаторы (THCV, CBD, ациклические монотерпены) напрямую конкурируют с фосфолипидом ванилоидного кармана, вытесняя его [10,85]. 2-APB, действуя аллостерически, вызывает его выталкивание за счет связывания в двух удаленных сайтах: у основания S1-S4 и в линкерном участке, соединяющим трансмембранный домен с доменом анкириновых повторов [10]. Как показано в настоящей диссертации, DDA занимает ванилоидный сайт, предположительно вытесняя конкурентно фосфолипид, но действуя обратимо, как показано в тесте на фармакологическую конкуренцию. В электрофизиологических записях CBD-вызванные токи медленно восстанавливались после ингибирования, вызванного DDA. Это медленное восстановление вероятно связано с локализацией взаимодействия в трансмембранном

сайте. Поскольку сначала происходит физико-химическое распределение гидрофобного ингибитора в липидной фазе, кажущаяся скорость диссоциации комплекса может быть низкой. Путь активации, включающий 2-APB энергетически превосходит путь CBD, поскольку 2-APB показывает в три раза большую активность по отношению к TRPV3 (Таблица 9). Это служит причиной, почему DDA ингибирует активацию 2-APB в больших концентрациях и медленнее. Тепло энергетически превосходит химические активаторы. Хотя в наших функциональных тестах невозможно напрямую сравнить их активности (максимальные эффекты), литературные данные определенно указывают на такой вывод. Тепловое открытие TRPV3 включает две стадии. Во время первой температурно-зависимой стадии активация происходит посредством «конформационной волны» структурных изменений в S2-S3 петле, N- и C-концевых участках [9]. Этот переход характеризуется высоким изменением энтальпии и энтропии, как показано нами в тестах на тепловую активацию. О высокой энергетике тепловой активации также свидетельствуют отдельные исследования, согласно которым она может быть сопряжена с частичной белковой денатурацией [168,187]. Также, продолжительная тепловая стимуляция способна вызывать расширение поры канала, которое проявляется в высочайшей проводимости и потере ионной селективности [33]. Предполагается, что это расширение поры может быть результатом перехода TRPV3 из тетрамерного в пентамерное состояние, которое было охарактеризовано при тепловой или очень сильной химической стимуляции [17,18]. Таким образом, наши результаты иллюстрируют неэквивалентность различных путей активации TRPV3 с помощью DDA в роли «различающего лигандного зонда».

Наши результаты также обращают внимание на ванилоидный сайт как на участок действия лигандов с потенциальным терапевтическим действием (“druggable” site). Насколько нам известно из анализа литературы, взаимная связь между селективностью к активационному стимулу и терапевтическим профилем лигандов TRPV3 ранее не изучалась. При этом, стоит отметить, что клиническое применение ингибиторов TRPV1 затруднено из-за терморегуляторных побочных эффектов (гипертермии), которые коррелируют с определенными активационными модальностями, такими как капсаицин или протоны [188]. Эта проблема способствовала разработке модально-селективных антагонистов TRPV1, в частности NEO6860, который селективно блокирует активацию, вызванную капсаицином, не действуя на термическую активацию, таким образом, вызывая анальгезию без гипертермии [189]. Ингибиторы TRPV3, которые не влияют на базальную тепловую активность канала, могут представлять собой более безопасную

терапевтическую стратегию, при которой не нарушается базальный гомеостаз кожи, однако, для подтверждения этой гипотезы требуются дополнительные исследования.

3.5 Цитотоксичность и биологическая активность DDA на животных

3.5.1 Цитотоксичность

Для оценки токсичности in vitro мы изучили, как DDA влияет на жизнеспособность кератиноцитов HaCaT с помощью колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток. Результаты показали, что DDA существенно не влияет на метаболическую активность клеток HaCaT в концентрации до 100 мкМ (Рисунок 21), что позволяет говорить о том, что этот диапазон концентраций нетоксичен для кератиноцитов и может быть использован в терапевтических целях. Полученный результат согласуется с литературными данными о нетоксичности DDA in vitro, как было показано на Т-лимфоцитах Jurkat [190], клетках легочного эпителия A549 и BEAS-2B, тучных клетках RBL-2H3 [191].

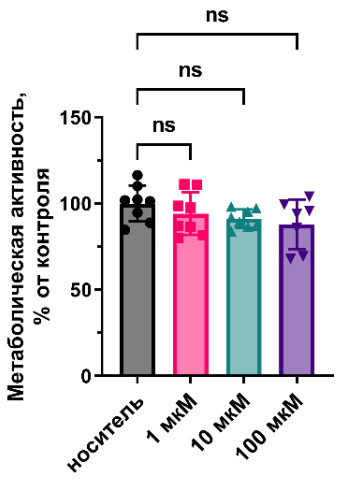


Рисунок 21. Метаболическая активность клеток после обработки различными концентрациями DDA (24 ч) (n = 7, 8). Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом множественных сравнений Даннетта, ns $p \geq 0,05$

3.5.2 Эффект DDA в модели зуда, вызванного карвакролом

Зуд – это ощущение, связанное с рефлексом или желанием чесать. Хронический зуд может быть изнурительным симптомом, сопровождающим многие воспалительные заболевания кожи, например, атопический дерматит [131,192]. Ощущение зуда возникает в первичных сенсорных нейронах, а именно немиелинизированных С-волокнах малого диаметра и миелинизированных А-волокнах [193]. Кроме того, сенсорные нейроны находятся под тонкой регуляцией со стороны собственного микроокружение, в первую

очередь кожных и иммунных клеток, которые могут модулировать активацию или сенсибилизацию нервных окончаний посредством паракринной коммуникации [194].

Из литературных данных известно, что химическая активация TRPV3 вызывает зуд у подопытных мышей. Для изучения процесса можно использовать поведенческую модель, основанную на введении пруритогена (вещества, вызывающего зуд), и подсчете числа эпизодов расчесываний. Ранее, поведенческая модель, основанная на внутрикожном введении монотерпена карвакрола, активатора TRPV3, и подсчете числа расчесываний места инъекции, была многократно успешно использована для оценки противозудной эффективности ингибиторов TRPV3 ([139], а также см. Таблица 5). Чтобы выяснить, способен ли DDA ослаблять зуд, вызванный прямой активацией TRPV3, мы сначала протестировали его в модели, основанной на карвакроле.

Схема эксперимента и результаты представлены на Рисунок 22.

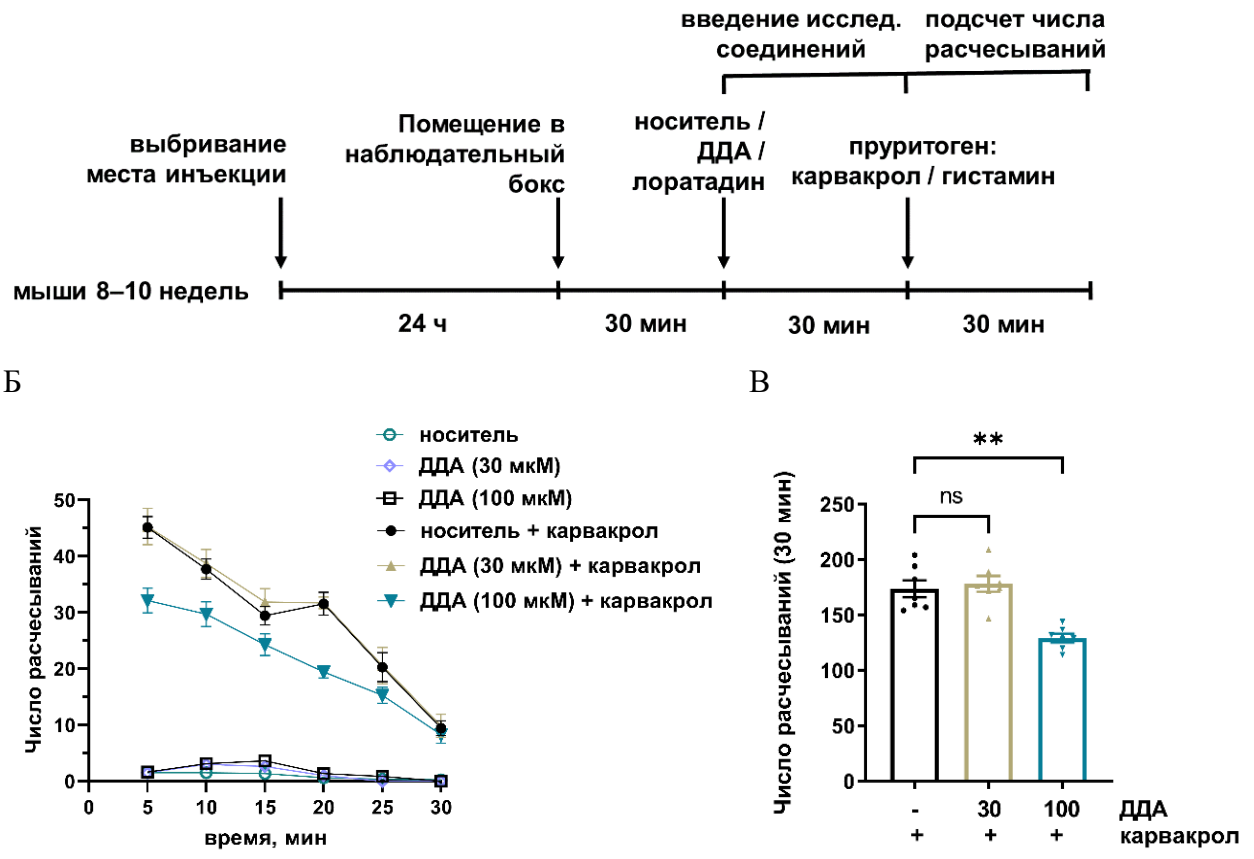


Рисунок 22. Эффект DDA в модели зуда, вызванного карвакролом. (А) Дизайн эксперимента для изучения зуда у мышей. (Б) Динамика расчесываний шеи после внутрикожной инъекции 50 мкл карвакрола (1%) после предварительной обработки носителем (физиологический раствор, 0,5% ДМСО) или DDA. (В) Суммарное число расчесываний в течение 30 минут по данным на панели А (n = 7). Однофакторный

дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом множественных сравнений Даннетта, ns $p \geq 0,05$, ** $p < 0,01$.

Внутрикожное введение носителя (физиологический раствор, 0,5% ДМСО) и DDA в концентрациях до 100 мкМ не вызывало у исследуемых животных значительного зуда в месте инъекции, что количественно выражается в количестве эпизодов расчесывания (носитель: 6,0 ± 1,0, n = 8; DDA 30 мкМ: 8,1 ± 0,7, n = 8; DDA 100 мкМ: 10,6 ± 0,8, n = 8). Внутрикожное введение 1% карвакрола (контрольная группа) вызвало острую реакцию зуда в месте инъекции (174 ± 7, n = 7). Контрольную группу сравнивали с группами, которым за 30 мин до введения карвакрола вводили DDA в различных концентрациях. В группе, получившей 50 мкл 30 мкМ DDA, интенсивность расчесываний была очень близка к контрольной (178 ± 7, n = 7). В группе, получавшей 50 мкл 100 мкМ DDA, наблюдалось значительное подавление реакции зуда, что выражалось как в динамике, так и в общем количестве расчесываний в течение периода наблюдения (129 ± 4, n = 7). Эти данные свидетельствуют о том, что DDA эффективно подавляет активацию TRPV3 in vivo и сопровождающий ее зуд.

На молекулярном уровне зуд может быть связан с функционированием целого ряда рецепторов: G-белок-связанных рецепторов, рецепторных тирозинкиназ (особенно рецепторов цитокинов), толл-подобных рецепторов и ионных каналов [131]. Среди ионных каналов особый интерес в недавних исследованиях вызывают TRP каналы. TRPV1 и TRPA1, участвующие в восприятии болезненных ощущений под действием высокой температуры, присутствуют в чувствительных к гистамину DRG нейронах малого диаметра, а у мышей с дефицитом TRPV1 или TRPA1 наблюдается снижение, хотя и не полная отмена, реакции на расчесывание под действием определенных пруритогенов [131]. TRPV4, который обильно экспрессируется в кератиноцитах, необходим для возникновения реакции расчесывания, вызванной гистамином и эндотелином-1, а мыши, у которых отсутствует TRPV4, демонстрируют снижение интенсивности расчесывания в модели хронического зуда сухой кожи [192].

TRPV3 – еще один TRPV канал, для которого установлена достоверная связь с генерацией и развитием кожного зуда. Согласно опубликованному исследованию [139], внутрикожное введение карвакрола вызывает реакцию зуда у мышей за счет активации TRPV3 и TRPA1. Нокаут гена TRPV3 у мышей приводит к снижению реакции на карвакрол (на 40-64% в зависимости от продолжительности эксперимента). Поскольку DDA не оказывал влияния на TRPA1 в тестах на селективность, можно утверждать, что подавление вызванного карвакролом зуда под действием DDA (~26% при 100 мкМ)

обусловлено ингибированием TRPV3. На данный момент, не существует доступного валидированного селективного ингибитора TRPV3, с которым можно было бы сравнивать эффективность DDA в модели зуда, вызванного карвакролом. Однако согласно литературным данным, в этом тесте изучались некоторые неселективные ингибиторы TRPV3. Местный анестетик диклонин эффективно ингибировал TRPV3 in vitro (IC_{50} 3,2 мкМ) и уменьшал количество приступов расчесывания (~41% при 10 мкМ, 100% при 50 мкМ), однако в условиях in vivo трудно отделить эффекты этого соединения на TRPV3 от действия на потенциал-зависимые натриевые каналы [61]. Форситозид B воздействует на различные клеточные сигнальные пути, а также ингибирует TRPV3 (IC_{50} 6,7 мкМ), при этом значительно уменьшая вызванный карвакролом зуд (~56% при 30 мкМ, 77% при 300 мкМ) [52].

3.5.3 Эффект DDA в модели зуда, вызванного гистамином

Гистамин является наиболее изученным медиатором зуда. Гистамин высвобождается в результате дегрануляции тучных клеток и, помимо прочего, связывается с гистаминовыми рецепторами чувствительных нейронов, ответственных за передачу ощущения зуда. У мышей с нокаутом по TRPV3 реакция на гистамин снижена в 3 раза по сравнению с мышами дикого типа [51]. У мышей с атопическим дерматитом и алопецией, вызванными мутантной изоформой TRPV3 с усилением функции, наблюдалось увеличение количества тучных клеток в коже и повышенный уровень гистамина [87,127]. Ингибитор TRPV3 форситозид B снижал реакцию мышей на гистамин на 57–89 % в концентрациях 0,3–30 мкМ [52]. Исходя из этого, мы протестировали DDA против зуда, вызванного гистамином, в условиях, аналогичных экспериментам с использованием карвакрола (Рисунок 23).

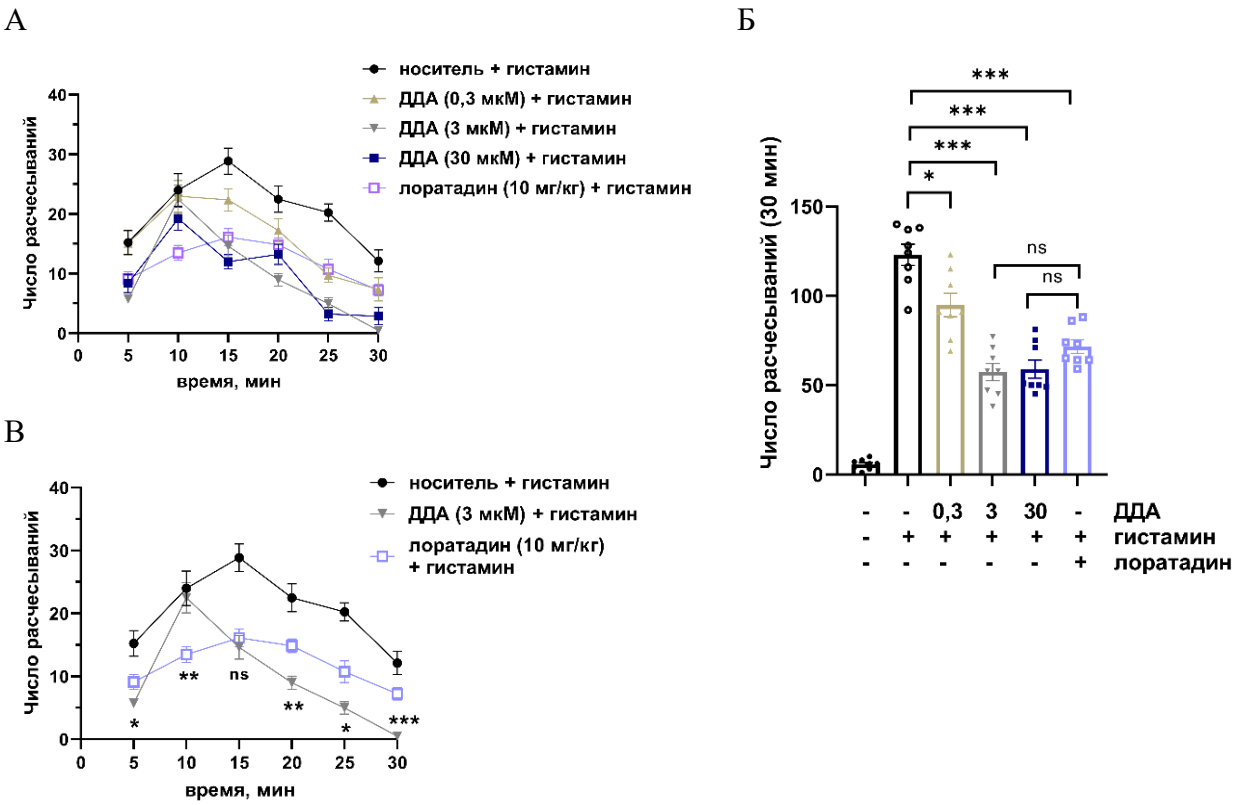


Рисунок 23. Эффект DDA в модели зуда, вызванного гистамином. (А) Динамика расчесываний шеи после внутрикожной инъекции 50 мкл гистамина (11 мМ) после предварительного введения носителя (физиологический раствор, 0,5% ДМСО), DDA или лоратадина (10 мг/кг). (Б) Суммарное число приступов расчесываний в течение 30 минут по данным на панели А (n = 8). (В) Статистические различия между количествами расчесываний в отдельные моменты времени после внутрикожной инъекции 50 мкл гистамина (11 мМ) после предварительного введения 3 мкМ DDA или лоратадина (10 мг/кг). Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом множественных сравнений Даннетта, ns $p \geq 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Внутрикожное введение 50 мкл гистамина (11 мМ) вызвало значительную реакцию зуда (123 ± 6 расчесываний за 30 мин, n = 8) по сравнению с носителем (Рисунок 23 А, Б). Предварительное введение DDA (50 мкл) значительно подавляло количество расчесываний, достигнув максимума эффекта при 3 мкМ (0,3 мкМ: 95 ± 7, n = 8; 3 мкМ: 57 ± 5, n = 8; 30 мкМ: 59 ± 5, n = 8). Мы сравнили противозудный эффект DDA с таковым у лоратадина, блокатора гистаминовых H1-рецепторов [195]. Лоратадин, вводимый перорально (10 мг/кг), оказывал противозудное действие, которое в суммарном количестве приступов расчесывания не превышало эффекта DDA в низких концентрациях (лоратадин 72 ± 4 против DDA 3 мкМ 57 ± 5 против DDA 30 мкМ 59 ± 5, n = 8) (Рисунок

23 Б). Кроме того, нами была отмечена значительная разница во временной динамике количества расчесываний между группами, принимавшими DDA и лоратадин, что, вероятно, можно объяснить различными механизмами действия двух препаратов (Рисунок 23 В). Если лоратадин достаточно равномерно снижал гистамин-вызванный зуд на протяжении времени наблюдения (30 мин), эффект DDA был менее монотонным. Характер эффекта DDA можно назвать отложенным: после значительного подавления зуда в начальные 5 минут после введения гистамина на 10 минуте эффект DDA полностью нивелировался, однако на отрезке 10-30 минут происходило стремительное развитие эффекта DDA вплоть до полного подавления расчесываний у мышей.

Помимо активации чувствительных нейронов, гистамин активирует кератиноциты через H4-рецепторы, что способствует развитию зуда [196]. Активация кератиноцитов приводит к сенситизации TRP каналов, в т.ч. TRPV3, и секреции дополнительных провоспалительных медиаторов (IL-6, IL-8, PGE_2, АТФ), которые усиливают воспаление и активируют сенсорные нейроны [99,113,197]. Интересно отметить, что средняя эффективность лоратадина и DDA была одинаковой, но временная динамика противозудного эффекта значительно отличалась. Лоратадин стабильно снижал острую реакцию на гистамин в течение всего периода наблюдения на 40-50%, в то время как эффект DDA был более сложным (Рисунок 23 А,В). На начальной стадии острой реакции на гистамин DDA показал эффект, равный или превосходящий эффект лоратадина; на втором этапе эффективность снизилась до нуля, но к концу периода наблюдения DDA значительно превосходил лоратадин (Рисунок 23 В). В целом, эти результаты указывают на значительный терапевтический потенциал DDA для коррекции кожного зуда, связанного с гистамином.

Для DDA ранее было показана противовоспалительная активность и более низкая токсичность в сравнении с андрографолидом [190,191]. В модели овальбумин-индуцированной астмы DDA эффективно подавлял аллергические проявления, уменьшая инфильтрацию эозинофилов, продукцию слизи, дегрануляцию тучных клеток, экспрессию провоспалительных биомаркеров в легочных тканях, а также гиперчувствительность дыхательных путей [191]. При этом, молекулярные механизмы того, как DDA проявляет свои противовоспалительные свойства, ранее не были известны. Для андрографолида показан механизм связывания с NF-κB p50, транскрипционным фактором воспалительного сигналинга, с образованием ковалентного комплекса, который препятствует связыванию NF-κB p50 с ДНК. Однако для DDA, по-видимому, подобный механизм не реализуется. Образование небольших количеств аддукта DDA с NF-κB p50

было зафиксировано с помощью масс-спектрометрии (меньше чем для андрографолида), однако в биологических тестах соединение не ингибировало активацию NF-κB p50 [190]. Таким образом, DDA, по-видимому, проявляет свою активность за счет иных молекулярных механизмов. Хотя неизвестно, способен ли DDA напрямую ингибировать H1-рецепторы, поскольку характеры действия DDA и лоратадина значительно различаются, мы предполагаем, что DDA действует по иному механизму, нежели антигистаминные препараты. Механизм, осуществляемый в случае применения DDA, может быть более эффективным при различных кожных патологиях, сопровождающихся зудом, однако требуются дальнейшие исследования для подтверждения этой гипотезы.

Материалы диссертации подтверждают известный тезис о том, что растительные экстракты являются богатым источником физиологически активных веществ. В современной разработке лекарств происходит сдвиг от эмпирического скрининга библиотек молекул к in silico конструированию молекул с заданной активностью, физико-химическими свойствами и профилем безопасности. При этом все еще высок интерес к природным молекулам и механизмам их действия, поскольку эти данные необходимы как основа для рационального дизайна. Фармакологическое действие на ванилоидный карман TRPV3 долгое время оставалось в тени, поскольку классические ванилоиды, действующие на гомологичный карман TRPV1, не активны по отношению к TRPV3 [198]. Результаты этой работы, а также нарастающее число публикаций других научных групп на эту тему, показывают, что этот сайт может рассматриваться как мишень прицельной разработки фармакологических лигандов (druggable site) на основе различных новых хемотипов.

Выводы

1. В качестве нового ингибитора TRPV3 идентифицирован лабдановый дитерпеноид 14-дезокси-11,12-дидегидроандрографолид (DDA), выделенный из экстракта растения *Andrographis paniculata*.

2. DDA высокоактивно ингибирует TRPV3 (IC_{50} 7 нМ для активации каннабидиолом; ~0,8 мкМ для активации 2-APB), не проявляя активности в отношении TRPV1, TRPV4, TRPA1, ASIC-каналов. DDA действует как конкурентный ингибитор при активации каннабидиолом, негативный аллостерический модулятор при активации 2-APB и не действует на тепловую активацию канала.

3. DDA связывается в ванилоидном кармане трансмембранной области TRPV3, сайте действия каннабидиола.

4. DDA эффективно подавляет зуд у животных при введении карвакрола и гистамина, оказывая эффект на уровне лоратадина в гистаминовой модели.

Благодарности

Автор выражает особую благодарность

научному руководителю д.х.н. Я.А. Андрееву,

к.х.н. Ю.В. Корольковой

и заведующему лабораторией д.х.н. С.А. Козлову.

Автор выражает отдельную благодарность коллективу лаборатории, а именно

к.х.н. Ю.А. Логашиной, к.х.н. Д.И. Осмакову, к.б.н. С.Г. Кошелеву, Е.Е. Малеевой, И.В. Мошаровой.

Автор также выражает благодарность

д.б.н. К.С. Минееву, к.х.н. О.А. Белозеровой и В.И. Шмыгареву за помощь в расшифровке химической структуры DDA,

коллективу лаборатории биологических испытаний ФИБХ в г. Пущино В.А. Паликову, Ю.А. Паликовой под руководством д.б.н. И.А. Дьяченко за эксперименты на мышах,

профессору Колумбийского университета А.И. Соболевскому за помощь в установлении структурных основ действия CBD и DDA.

Список сокращений

АИТЦ	аллил изотиоцианат
а.о.	аминокислотный остаток
АТФ	аденозинтрифосфорная кислота
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ДМСО	диметилсульфоксид
к.т.	кальциевый тест
кРНК	комплементарная РНК
МСТ	микроскопический термофорез
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ТФУ	трифторуксусная кислота
УФ	ультрафиолет
э/ф	электрофизиология
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
2-APB	2-аминоэтоксидифенил борат
AIFM1	фактор 1, индуцирующий апоптоз
ANOVA	однофакторный дисперсионный анализ
ARD	домен анкириновых повторов (ankyrin repeat domain)
BAPTA	1,2-бис(2-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота
CB	каннабиноидный рецептор
CBD	каннабидиол
CFA	полный адъювант Фрейнда
c-Fos	Fos протоонкоген
CHO	клеточная линия (Chinese hamster ovary)
DDA	14-дезокси-11,12-дидегидроандрографолид
DMH-Δ8-THC	депентенил-α,α-диметилгептил-Δ8-тетрагидроканнабинол
DPBA	дифенилбороновый ангидрид
DPTHF	дифенилтетрагидрофуран
DRG	ганглии спинномозговых корешков
EGFR	рецептор эпидермального фактора роста
FPP	фарнезил пирофосфат
HEPES	4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
HMBC	гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия
Hs	человек (Homo sapiens)
HSQC	гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия
i.d.	внутрикожно (intradermal)
i.p.	внутрибрюшинно (intraperitoneal)
IL-1α	интерлейкин-1α
IPP	изопентенилпирофосфат
IUPHAR	Международный союз фундаментальной и клинической фармакологии (International Union of Basic and Clinical Pharmacology)
LH	линкерная спираль (linker helix)
MAE	2-метиламиноэтанол

mbtps2	протеаза сайта 2 мембраносвязанного фактора транскрипции
MES	2-(N-морфолино)-этансульфоновая кислота
MIF	фактор ингибирования миграции макрофагов
Mm	мышь (Mus musculus)
mTOR	механическая мишень рапамицина
n/a	неприменимо
NF-κB	ядерный фактор каппа-B
NMDG	N-метил-D-глюкамин
p.o.	перорально (peroral)
PAR2	рецептор, активируемый протеазой 2
PARP1	поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1
PDB	база данных "Protein Data Bank"
PDB ID	идентификатор базы PDB
perp	эффектор апоптоза p53, связанный с PMP-22
PGE2	простагландин E2
Rn	крыса (Rattus norvegicus)
SLIGRL-NH_2	пептид-активатор PAR2 (серин-лейцин-изолейцин-глицин-аргинин-лейцин-NH2)
TGF-α	трансформирующий фактор роста-α
THCV	тетрагидроканнабиварин
TLR2	толл-подобный рецептор 2
TMD	трансмембранный домен (transmemrane domain)
Tris	трис(гидроксиметил)аминометан
TRP каналы	каналы временного рецепторного потенциала
TRPV каналы	ванилоидные каналы временного рецепторного потенциала
wt	дикий тип

Список литературы

1. Xu H. et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel // Nature. 2002. Vol. 418, № 6894. P. 181–186.
2. Smith G.D. et al. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein // Nature. 2002. Vol. 418, № 6894. P. 186–190.
3. Peier A.M. et al. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes // Science (80-.). 2002. Vol. 296, № 5575. P. 2046–2049.
4. Blair N.T. et al. Transient Receptor Potential channels (TRP) in GtoPdb v.2025.1 // IUPHAR/BPS Guid. to Pharmacol. CITE. 2025. Vol. 2025, № 1.
5. Singh A.K., McGoldrick L.L., Sobolevsky A.I. Structure and gating mechanism of the transient receptor potential channel TRPV3 // Nat. Struct. Mol. Biol. Springer US, 2018. Vol. 25, № 9. P. 805–813.
6. Neuberger A., Nadezhdin K.D., Sobolevsky A.I. Structural mechanism of TRPV3 channel inhibition by the anesthetic dyclonine // Nat. Commun. Springer US, 2022. Vol. 13, № 1. P. 1–9.
7. Neuberger A. et al. Structural mechanism of TRPV3 channel inhibition by the plant-derived coumarin osthole // EMBO Rep. 2021. Vol. 22, № 11.
8. Singh A.K. et al. Structural basis of temperature sensation by the TRP channel TRPV3 // Nat. Struct. Mol. Biol. 2019. Vol. 26, № 11. P. 994–998.
9. Nadezhdin K.D. et al. Structural mechanism of heat-induced opening of a temperature-sensitive TRP channel // Nat. Struct. Mol. Biol. Springer US, 2021. Vol. 28, № 7. P. 564–572.
10. Nadezhdin K.D. et al. TRPV3 activation by different agonists accompanied by lipid dissociation from the vanilloid site // Sci. Adv. 2024. Vol. 10, № 18. P. 1–12.
11. Deng Z. et al. Gating of human TRPV3 in a lipid bilayer // Nat. Struct. Mol. Biol. Nature Publishing Group, 2020. Vol. 27, № 7. P. 635–644.
12. Zubcevic L. et al. Conformational ensemble of the human TRPV3 ion channel // Nat. Commun. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 9, № 1. P. 4773.
13. Talyzina I.A., Nadezhdin K.D., Sobolevsky A.I. Forty sites of TRP channel regulation // Curr. Opin. Chem. Biol. The Author(s), 2025. Vol. 84. P. 102550.
14. Phelps C.B. et al. Differential regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 sensitivity through a conserved binding site on the ankyrin repeat domain // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285, № 1. P. 731–740.

15. Yelshanskaya M. V., Sobolevsky A.I. Ligand-Binding Sites in Vanilloid-Subtype TRP Channels // Front. Pharmacol. 2022. Vol. 13, № May. P. 1–21.
16. Gao Y. et al. TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action // Nature. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 534, № 7607. P. 347–351.
17. Lansky S. et al. A pentameric TRPV3 channel with a dilated pore // Nature. Springer US, 2023. Vol. 621, № 7977. P. 206–214.
18. Lansky S. et al. Structural dynamics and permeability of the TRPV3 pentamer // Nat. Commun. . Springer US, 2025. Vol. 16, № 1. P. 1–15.
19. Keynes R.D. Ionic Channels of Excitable Membranes // Trends in Neurosciences. 3rd ed. Sunderland, MA, 1985. Vol. 8. 226 p.
20. Kashio M., Tominaga M. TRP channels in thermosensation // Curr. Opin. Neurobiol. The Author(s), 2022. Vol. 75. P. 102591.
21. McKemy D.D., Neuhausser W.M., Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation // Nature. 2002. Vol. 416, № 6876. P. 52–58.
22. Peier A.M. et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol // Cell. Elsevier B.V., 2002. Vol. 108, № 5. P. 705–715.
23. Güler A.D. et al. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4 // J. Neurosci. 2002. Vol. 22, № 15. P. 6408–6414.
24. Liu B., Hui K., Qin F. Thermodynamics of Heat Activation of Single Capsaicin Ion Channels VR1 // Biophys. J. Elsevier, 2003. Vol. 85, № 5. P. 2988–3006.
25. Yao J., Liu B., Qin F. Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011. Vol. 108, № 27. P. 11109–11114.
26. Voets T. et al. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels // Nature. 2004. Vol. 430, № 7001. P. 748–754.
27. Caterina M.J. et al. The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway // Nature. 1997. Vol. 389, № 6653. P. 816–824.
28. Cheng W. et al. Heteromeric heat-sensitive transient receptor potential channels exhibit distinct temperature and chemical response // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287, № 10. P. 7279–7288.
29. Chung M.K. et al. 2-Aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3 // J. Neurosci. 2004. Vol. 24, № 22. P. 5177–5182.
30. Xu H. et al. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate

specific TRP channels // Nat. Neurosci. 2006. Vol. 9, № 5. P. 628–635.

31. Xiao R. et al. Calcium plays a central role in the sensitization of TRPV3 channel to repetitive stimulations // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283, № 10. P. 6162–6174.
32. Liu B. et al. Hysteresis of gating underlines sensitization of TRPV3 channels // J. Gen. Physiol. 2011. Vol. 138, № 5. P. 509–520.
33. Chung M.K., Güler A.D., Caterina M.J. Biphasic currents evoked by chemical or thermal activation of the heat-gated ion channel, TRPV3 // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, № 16. P. 15928–15941.
34. Virginio C. et al. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels // Nat. Neurosci. 1999. Vol. 2, № 4. P. 315–321.
35. Ferreira L.G.B., Faria R.X. TRPing on the pore phenomenon: what do we know about transient receptor potential ion channel-related pore dilation up to now? // J. Bioenerg. Biomembr. 2016. Vol. 48, № 1. P. 1–12.
36. Deering-Rice C.E. et al. Drofenine: a 2-APB analog with improved selectivity for human TRPV3 // Pharmacol. Res. Perspect. 2014. Vol. 2, № 5. P. 1–10.
37. Maier M. et al. KS0365, a novel activator of the transient receptor potential vanilloid 3 (TRPV3) channel, accelerates keratinocyte migration // Br. J. Pharmacol. 2022. Vol. 179, № 24. P. 5290–5304.
38. Vogt-Eisele A.K. et al. Monoterpenoid agonists of TRPV3 // Br. J. Pharmacol. 2007. Vol. 151, № 4. P. 530–540.
39. Stotz S.C. et al. Citral sensing by TRANSient receptor potential channels in dorsal root ganglion neurons // PLoS One. 2008. Vol. 3, № 5.
40. Macpherson L.J. et al. More than cool: Promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds // Mol. Cell. Neurosci. 2006. Vol. 32, № 4. P. 335–343.
41. Bang S. et al. Farnesyl pyrophosphate is a novel pain-producing molecule via specific activation of TRPV3 // J. Biol. Chem. Elsevier, 2010. Vol. 285, № 25. P. 19362–19371.
42. Pollastro F. et al. Neuroactive and Anti-inflammatory Frankincense Cembranes: A Structure-Activity Study // J. Nat. Prod. 2016. Vol. 79, № 7. P. 1762–1768.
43. Moussaieff A. et al. Incensole acetate, an incense component, elicits psychoactivity by activating TRPV3 channels in the brain // FASEB J. The Federation of American Societies for Experimental Biology, 2008. Vol. 22, № 8. P. 3024–3034.
44. Gao S. et al. Unusual ent-Labdane Diterpenoid Dimers and their Selective Activation of TRPV Channels // J. Org. Chem. 2019. Vol. 84, № 21. P. 13595–13603.
45. Mattoteia D. et al. The combined effect of branching and elongation on the bioactivity

profile of phytocannabinoids. Part i: Thermo-trps // Biomedicines. 2021. Vol. 9, № 8. P. 1070.

46. de Petrocellis L. et al. Cannabinoid actions at TRPV channels: Effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation // Acta Physiol. 2012. Vol. 204, № 2. P. 255–266.
47. Bang S. et al. Isopentenyl pyrophosphate is a novel antinociceptive substance that inhibits TRPV3 and TRPA1 ion channels // Pain. 2011. Vol. 152, № 5. P. 1156–1164.
48. Muller C., Morales P., Reggio P.H. Cannabinoid ligands targeting TRP channels // Front. Mol. Neurosci. 2019. Vol. 11, № January. P. 1–15.
49. Prakriya M., Lewis R.S. Store-operated calcium channels // Physiol. Rev. American Physiological Society, 2015. Vol. 95, № 4. P. 1383–1436.
50. Bang S. et al. 17(R)-resolvin D1 specifically inhibits transient receptor potential ion channel vanilloid 3 leading to peripheral antinociception // Br. J. Pharmacol. 2012. Vol. 165, № 3. P. 683–692.
51. Sun X.Y. et al. Antipruritic effect of natural coumarin osthole through selective inhibition of thermosensitive TRPV3 channel in the skin // Mol. Pharmacol. 2018. Vol. 94, № 4. P. 1164–1173.
52. Zhang H. et al. Pharmacological inhibition of the temperature-sensitive and Ca21-permeable transient receptor potential vanilloid TRPV3 channel by natural forsythoside B attenuates pruritus and cytotoxicity of keratinocytes // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2019. Vol. 368, № 1. P. 21–31.
53. Sun X. et al. Anti-pruritic and anti-inflammatory effects of natural verbascoside through selective inhibition of temperature-sensitive Ca2+-permeable TRPV3 channel // J. Dermatol. Sci. 2020. Vol. 97, № 3. P. 229–231.
54. Han Y. et al. A plant-derived TRPV3 inhibitor suppresses pain and itch // Br. J. Pharmacol. 2021. Vol. 178, № 7. P. 1669–1683.
55. Qi H. et al. Inhibition of temperature-sensitive TRPV3 channel by two natural isochlorogenic acid isomers for alleviation of dermatitis and chronic pruritus // Acta Pharm. Sin. B. Chinese Pharmaceutical Association and Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, 2022. Vol. 12, № 2. P. 723–734.
56. Sun S.W. et al. Identification of Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Antagonists from Achillea alpina L. And separation by liquid-liquid-refining extraction and high-speed counter-current chromatography // Molecules. 2020. Vol. 25, № 9. P. 2025.
57. Wang Y. et al. Scutellarein attenuates atopic dermatitis by selectively inhibiting transient

receptor potential vanilloid 3 channels // British Journal of Pharmacology. 2022. Vol. 179, № 20. 4792–4808 p.

58. Dang T.H. et al. Alpha-Mangostin: A Potent Inhibitor of TRPV3 and Pro-Inflammatory Cytokine Secretion in Keratinocytes // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, № 16. P. 12930.
59. Korolkova Y. et al. Marine cyclic guanidine alkaloids monanchomycalin B and urupocidin a act as inhibitors of TRPV1, TRPV2 and TRPV3, but not TRPA1 receptors // Mar. Drugs. 2017. Vol. 15, № 4. P. 1–10.
60. Kim S.E. et al. Multiple Effects of Echinochrome A on Selected Ion Channels Implicated in Skin Physiology // Mar. Drugs. 2023. Vol. 21, № 2. P. 78.
61. Liu Q. et al. Therapeutic inhibition of keratinocyte trpv3 sensory channel by local anesthetic dyclonine // Elife. 2021. Vol. 10. P. 1–22.
62. Zhang B. et al. Inhibition of transient receptor potential vanilloid 3 channels by antimalarial hydroxychloroquine alleviates TRPV3-dependent dermatitis // J. Biol. Chem. 2024. Vol. 300, № 10. P. 107733.
63. Horishita R. et al. Local Anesthetics Inhibit Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 3 Channel Function in Xenopus Oocytes // Anesth. Analg. 2021. Vol. 132, № 6. P. 1756–1767.
64. Lv M. et al. The design and synthesis of transient receptor potential vanilloid 3 inhibitors with novel skeleton // Bioorg. Chem. 2021. Vol. 114. P. 105115.
65. Gomtsyan A. et al. Synthesis and Pharmacology of (Pyridin-2-yl)methanol Derivatives as Novel and Selective Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Antagonists // J. Med. Chem. 2016. Vol. 59, № 10. P. 4926–4947.
66. Bischof M. et al. TRPV3 endogenously expressed in murine colonic epithelial cells is inhibited by the novel TRPV3 blocker 26E01 // Cell Calcium. Elsevier Ltd, 2020. Vol. 92, № October. P. 102310.
67. Zhang F. et al. Computational discovery, structural optimization and biological evaluation of novel inhibitors targeting transient receptor potential vanilloid type 3 (TRPV3) // Bioorg. Chem. Elsevier Inc., 2021. Vol. 114, № May. P. 105093.
68. Fan J. et al. Structural basis of TRPV3 inhibition by an antagonist // Nat. Chem. Biol. Springer US, 2023. Vol. 19, № 1. P. 81–90.
69. Yang N.N. et al. Osthole inhibits histamine-dependent itch via modulating TRPV1 activity // Sci. Rep. 2016. Vol. 6, № 1. P. 25657.
70. Torres K. V. et al. The coumarin osthole is a non-electrophilic agonist of TRPA1 // Neurosci. Lett. 2022. Vol. 789. P. 136878.

71. Yang H. et al. Stimulation of airway and intestinal mucosal secretion by natural coumarin CFTR activators // Front. Pharmacol. 2011. Vol. SEP.
72. Leung Y.M. et al. Osthol is a use-dependent blocker of voltage-gated Na+ channels in mouse neuroblastoma N2A cells // Planta Med. 2010. Vol. 76, № 1. P. 34–40.
73. Wu L. et al. Therapeutic potential of phenylethanoid glycosides: A systematic review // Med. Res. Rev. 2020. Vol. 40, № 6. P. 2605–2649.
74. Makarieva T.N. et al. Pulchranins B and C, new acyclic guanidine alkaloids from the far-eastern marine sponge Monanchora pulchra // Nat. Prod. Commun. 2013. Vol. 8, № 9. P. 1229–1232.
75. Ogurtsova E.K. et al. Inhibitory activity on trp receptors of pentacyclic alkaloids from the fungus Haliclona (gellius) sp. // Chem. Nat. Compd. 2015. Vol. 51, № 1. P. 194–196.
76. Ogurtsova E.K. et al. New derivatives of natural acyclic guanidine alkaloids with TRPV receptor-regulating properties // Nat. Prod. Commun. 2015. Vol. 10, № 7. P. 1171–1173.
77. Hu H.Z. et al. 2-Aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3 // J. Biol. Chem. Â© 2004 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 2004. Vol. 279, № 34. P. 35741–35748.
78. Hwang S.W. et al. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: Endogenous capsaicin-like substances // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000. Vol. 97, № 11. P. 6155–6160.
79. Kumar R. et al. Activation of transient receptor potential vanilloid 1 by lipoxygenase metabolites depends on PKC phosphorylation // FASEB J. 2017. Vol. 31, № 3. P. 1238–1247.
80. Watanabe H. et al. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels // Nature. 2003. Vol. 424, № 6947. P. 434–438.
81. Hu H.Z. et al. Potentiation of TRPV3 channel function by unsaturated fatty acids // J. Cell. Physiol. 2006. Vol. 208, № 1. P. 201–212.
82. Niu C. et al. Molecular determinants for the chemical activation of the warmth-sensitive TRPV3 channel by the natural monoterpenoid carvacrol // J. Biol. Chem. 2022. Vol. 298, № 3. P. 101706.
83. Wang P. et al. Vagal nerve TRPV3 regulates sedative-mediated appeasement // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proc Natl Acad Sci U S A, 2026. Vol. 123, № 16.
84. Zubcevic L. et al. Regulatory switch at the cytoplasmic interface controls trpv channel gating // Elife. Elife, 2019. Vol. 8.

85. Li Y. et al. Plant essential oil targets TRPV3 for skin renewal and structural mechanism of action // Nat. Commun. . Springer US, 2025. Vol. 16, № 1.
86. Liebe F. et al. The TRPV3 channel of the bovine rumen: localization and functional characterization of a protein relevant for ruminal ammonia transport // Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 2020. Vol. 472, № 6. P. 693–710.
87. Asakawa M. et al. Association of a mutation in TRPV3 with defective hair growth in rodents // J. Invest. Dermatol. 2006. Vol. 126, № 12. P. 2664–2672.
88. Yan K. et al. Pharmacological activation of thermo–transient receptor potential vanilloid 3 channels inhibits hair growth by inducing cell death of hair follicle outer root sheath // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2019. Vol. 370, № 2. P. 299–307.
89. Luo J. et al. Tonic inhibition of TRPV3 by Mg2+ in mouse epidermal keratinocytes // J. Invest. Dermatol. 2012. Vol. 132, № 9. P. 2158–2165.
90. Facer P. et al. Differential expression of the capsaicin receptor TRPV1 and related novel receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in normal human tissues and changes in traumatic and diabetic neuropathy // BMC Neurol. 2007. Vol. 7. P. 11.
91. Hamamoto T. et al. Localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV) in the human larynx // Acta Otolaryngol. 2009. Vol. 129, № 5. P. 560–568.
92. Sobhan U. et al. Immunolocalization and distribution of functional temperature-sensitive TRP channels in salivary glands // Cell Tissue Res. 2013. Vol. 354, № 2. P. 507–519.
93. Moayedi Y. et al. Localization of TRP channels in healthy oral mucosa from human donors // eNeuro. 2022. Vol. 9, № 6. P. 1–45.
94. Moqrich A. et al. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin // Science (80-.). 2005. Vol. 307, № 5714. P. 1468–1472.
95. Huang S.M. et al. TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation // Mol. Pain. 2011. Vol. 7. P. 37.
96. Marics I. et al. Acute heat-evoked temperature sensation is impaired but not abolished in mice lacking TRPV1 and TRPV3 channels // PLoS One. 2014. Vol. 9, № 6. P. e99828.
97. Starobova H. et al. The role of the neuronal microenvironment in sensory function and pain pathophysiology // J. Neurochem. 2024. Vol. 168, № 11. P. 3620–3643.
98. Chung M.K. et al. TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279, № 20. P. 21569–21575.
99. Mandadi S. et al. TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP // Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 2009. Vol. 458, № 6. P. 1093–1102.
100. Gifford J.R. et al. Changes in dermal interstitial ATP levels during local heating of human

skin // J. Physiol. 2012. Vol. 590, № 24. P. 6403–6411.

101. Karashima Y. et al. Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1 // J. Neurosci. 2007. Vol. 27, № 37. P. 9874–9884.
102. Price E. et al. Crispr deletion of a sva retrotransposon demonstrates function as a cis-regulatory element at the TRPV1/TRPV3 intergenic region // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, № 4. P. 1–16.
103. Wu S.W., Lindberg J.E.M., Peters J.H. Genetic and pharmacological evidence for low-abundance TRPV3 expression in primary vagal afferent neurons // Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol. 2016. Vol. 310, № 9. P. R794–R805.
104. Ślęczkowska M. et al. Peripheral Ion Channel Genes Screening in Painful Small Fiber Neuropathy // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, № 22.
105. Carreño O. et al. SNP variants within the vanilloid TRPV1 and TRPV3 receptor genes are associated with migraine in the Spanish population // Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. 2012. Vol. 159 B, № 1. P. 94–103.
106. Duchatelet S. et al. A new TRPV3 missense mutation in a patient with Olmsted syndrome and erythromelalgia // JAMA Dermatology. 2014. Vol. 150, № 3. P. 303–306.
107. Sasase T., Fatchiyah F., Ohta T. Transient receptor potential vanilloid (TRPV) channels: Basal properties and physiological potential // Gen. Physiol. Biophys. 2022. Vol. 41, № 3. P. 165–190.
108. Fatima M. et al. Abnormal Somatosensory Behaviors Associated With a Gain-of-Function Mutation in TRPV3 Channels // Front. Mol. Neurosci. 2022. Vol. 14. P. 790435.
109. Yamamoto-Kasai E. et al. TRPV3 as a therapeutic target for itch // J. Invest. Dermatol. 2012. Vol. 132, № 8. P. 2109–2112.
110. Nilius B., Bíró T. TRPV3: A “more than skinny” channel // Exp. Dermatol. 2013. Vol. 22, № 7. P. 447–452.
111. Qu Y. et al. Inhibition of the warm temperature–activated Ca2+-permeable transient receptor potential vanilloid TRPV3 channel attenuates atopic dermatitis // Mol. Pharmacol. 2019. Vol. 96, № 3. P. 393–400.
112. Zhao J. et al. PAR2 Mediates Itch via TRPV3 Signaling in Keratinocytes // J. Invest. Dermatol. 2020. Vol. 140, № 8. P. 1524–1532.
113. Huang S.M. et al. Overexpressed transient receptor potential vanilloid 3 ion channels in skin keratinocytes modulate pain sensitivity via prostaglandin E2 // J. Neurosci. 2008. Vol. 28, № 51. P. 13727–13737.
114. Mandadi S. et al. Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through

PKCε-mediated phosphorylation at S800 // Pain. 2006. Vol. 123, № 1–2. P. 106–116.

115. McGaraughty S. et al. TRPV3 modulates nociceptive signaling through peripheral and supraspinal sites in rats // J. Neurophysiol. 2017. Vol. 118, № 2. P. 904–916.
116. Broad L.M. et al. TRPV3 in drug development // Pharmaceuticals. 2016. Vol. 9, № 3. P. 1–17.
117. M. Reilly R., R. Kym P. Analgesic Potential of TRPV3 Antagonists // Curr. Top. Med. Chem. 2011. Vol. 11, № 17. P. 2210–2215.
118. Koivisto A.P. et al. Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies // Nat. Rev. Drug Discov. 2022. Vol. 21, № 1. P. 41–59.
119. Luo J., Hu H. Thermally Activated TRPV3 Channels // Current Topics in Membranes. 2014. Vol. 74, № 1. P. 325–364.
120. Kumar S. et al. Transient receptor potential vanilloid 1-6 (Trpv1-6) gene expression in the mouse brain during estrous cycle // Brain Res. 2018. Vol. 1701. P. 161–170.
121. Singh U. et al. Transient Receptor Potential Vanilloid 3 (TRPV3) in the Cerebellum of Rat and Its Role in Motor Coordination // Neuroscience. 2020. Vol. 424. P. 121–132.
122. Voronova I.P., Tuzhikova A.A., Kozyreva T. V. [Thermosensitive TRP channels gene expression in hypothalamus of normal rats and rats adapted to cold]. // Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova. 2012. Vol. 98, № 9. P. 1101–1110.
123. Brown T.E. et al. Loss of Interneuron LTD and Attenuated Pyramidal cell LTP in Trpv1 and Trpv3 KO mice // Hippocampus. 2013. Vol. 23, № 8. P. 662–671.
124. Moussaieff A. et al. Protective effects of incensole acetate on cerebral ischemic injury // Brain Res. 2012. Vol. 1443. P. 89–97.
125. Chen X., Zhang J., Wang K.W. Inhibition of intracellular proton-sensitive Ca2+-permeable TRPV3 channels protects against ischemic brain injury // Acta Pharm. Sin. B. 2022. Vol. 12, № 5. P. 2330–2347.
126. Um J.Y. et al. TRPV3 and Itch: The Role of TRPV3 in Chronic Pruritus according to Clinical and Experimental Evidence // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, № 23.
127. Yoshioka T. et al. Impact of the Gly573Ser substitution in TRPV3 on the development of allergic and pruritic dermatitis in mice // J. Invest. Dermatol. 2009. Vol. 129, № 3. P. 714–722.
128. Kim H.O. et al. Increased activity of TRPV3 in keratinocytes in hypertrophic burn scars with postburn pruritus // Wound Repair Regen. 2016. Vol. 24, № 5. P. 841–850.
129. Logashina Y.A. et al. TRPA1 Channel as a Regulator of Neurogenic Inflammation and Pain: Structure, Function, Role in Pathophysiology, and Therapeutic Potential of Ligands

// Biochem. 2019. Vol. 84, № 2. P. 101–118.

130. Gladkikh I.N. et al. TRPV1 Ion Channel: Structural Features, Activity Modulators, and Therapeutic Potential // Biochemistry (Moscow). 2021. Vol. 86, № S1. P. S50–S70.
131. Sun S., Dong X. Trp channels and itch // Semin. Immunopathol. Seminars in Immunopathology, 2016. Vol. 38, № 3. P. 293–307.
132. Yin W. et al. Complete Freund's adjuvant-induced decrement of pruriceptor-mediated suppression of itch // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). 2021. Vol. 53, № 5. P. 538–546.
133. Shim W.S. et al. TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase // J. Neurosci. 2007. Vol. 27, № 9. P. 2331–2337.
134. Wei Z. et al. TRPV3 promotes sebocyte inflammation via transcriptional modulating TLR2 in acne // Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 2024. Vol. 1870, № 5. P. 167195.
135. Nattkemper L.A. et al. Neuroimmune Mediators of Pruritus in Hispanic Scalp Psoriatic Itch // Acta Derm. Venereol. Acta Derm Venereol, 2023. Vol. 103.
136. Ji Z. et al. A metabolic alarmin from keratinocytes potentiates systemic humoral immunity // Nature. Nature Publishing Group, 2026. Vol. 652, № 8108. P. 209–219.
137. Qu Y. et al. Inhibition of cutaneous heat-sensitive Ca2+-permeable transient receptor potential vanilloid 3 channels alleviates UVB-induced skin lesions in mice // FASEB J. 2023. Vol. 37, № 12. P. 1–14.
138. Wang Y. et al. TRPV3 enhances skin keratinocyte proliferation through EGFR-dependent signaling pathways // Cell Biol. Toxicol. Cell Biology and Toxicology, 2021. Vol. 37, № 2. P. 313–330.
139. Cui T.T. et al. A pivotal role for the activation of TRPV3 channel in itch sensations induced by the natural skin sensitizer carvacrol // Acta Pharmacol. Sin. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 39, № 3. P. 331–335.
140. Caengprasath N. et al. MBTPS2, a membrane bound protease, underlying several distinct skin and bone disorders // J. Transl. Med. 2021. Vol. 19, № 1. P. 114.
141. Haghighi A. et al. A missense mutation in the MBTPS2 gene underlies the x-linked form of olmsted syndrome // J. Invest. Dermatol. 2013. Vol. 133, № 2. P. 571–573.
142. Duchatelet S. et al. Mutations in PERP Cause Dominant and Recessive Keratoderma // J. Invest. Dermatol. 2019. Vol. 139, № 2. P. 380–390.
143. Dai S. et al. Olmsted syndrome with alopecia universalis caused by heterozygous mutation in PERP // Br. J. Dermatol. 2020. Vol. 182, № 1. P. 242–244.

144. Jain A., Sahu R.P., Goswami C. Olmsted syndrome causing point mutants of TRPV3 (G568C and G568D) show defects in intracellular Ca2+-mobilization and induce lysosomal defects // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2022. Vol. 628. P. 32–39.
145. Zhong W. et al. Genotype–Phenotype Correlation of TRPV3-Related Olmsted Syndrome // J. Invest. Dermatol. 2021. Vol. 141, № 3. P. 545–554.
146. Duchatelet S., Hovnanian A. Olmsted syndrome: Clinical, molecular and therapeutic aspects // Orphanet J. Rare Dis. 2015. Vol. 10, № 1. P. 33.
147. Greco C. et al. Use of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Erlotinib to Treat Palmoplantar Keratoderma in Patients with Olmsted Syndrome Caused by TRPV3 Mutations // JAMA Dermatology. 2020. Vol. 156, № 2. P. 191–195.
148. Guo Y. et al. Novel Insights into the Role of Keratinocytes-Expressed TRPV3 in the Skin // Biomolecules. 2023. Vol. 13, № 3. P. 513.
149. Yadav M., Goswami C. TRPV3 mutants causing Olmsted Syndrome induce impaired cell adhesion and nonfunctional lysosomes // Channels. 2017. Vol. 11, № 3. P. 196–208.
150. Xiao R. et al. The TRPV3 mutation associated with the hairless phenotype in rodents is constitutively active // Cell Calcium. 2008. Vol. 43, № 4. P. 334–343.
151. Song Z. et al. TRPV3-Activated PARP1/AIFM1/MIF Axis through Oxidative Stress Contributes to Atopic Dermatitis // J. Invest. Dermatol. 2024. Vol. 144, № 12. P. 2695-2705.e8.
152. Zhang A. et al. Targeted Inhibition of the Epidermal Growth Factor Receptor and Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathways in Olmsted Syndrome // JAMA Dermatology. 2020. Vol. 156, № 2. P. 196–200.
153. Aijima R. et al. The thermosensitive TRPV3 channel contributes to rapid wound healing in oral epithelia // FASEB J. 2015. Vol. 29, № 1. P. 182–192.
154. Sahu R.P., Goswami C. Presence of TRPV3 in macrophage lysosomes helps in skin wound healing against bacterial infection // Exp. Dermatol. 2023. Vol. 32, № 1. P. 60–74.
155. Romano B. et al. Pure Δ9-tetrahydrocannabivarin and a Cannabis sativa extract with high content in Δ9-tetrahydrocannabivarin inhibit nitrite production in murine peritoneal macrophages // Pharmacol. Res. 2016. Vol. 113, № Pt A. P. 199–208.
156. Miyamoto T. et al. TRPV3 regulates nitric oxide synthase-independent nitric oxide synthesis in the skin // Nat. Commun. Nat Commun, 2011. Vol. 2, № 1. P. 369.
157. Song Z. et al. Hair Loss Caused by Gain-of-Function Mutant TRPV3 Is Associated with Premature Differentiation of Follicular Keratinocytes // J. Invest. Dermatol. 2021. Vol. 141, № 8. P. 1964–1974.

158. Borbíró I. et al. Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth // J. Invest. Dermatol. 2011. Vol. 131, № 8. P. 1605–1614.
159. Choi J.Y. et al. Olmsted syndrome caused by a heterozygous p.Gly568val missense mutation in TRPV3 gene // Yonsei Med. J. 2018. Vol. 59, № 2. P. 341–344.
160. Lin Z. et al. Exome sequencing reveals mutations in TRPV3 as a cause of Olmsted syndrome // Am. J. Hum. Genet. 2012. Vol. 90, № 3. P. 558–564.
161. Mecklenburg L. et al. The nude mouse skin phenotype: The role of Foxn1 in hair follicle development and cycling // Exp. Mol. Pathol. 2001. Vol. 71, № 2. P. 171–178.
162. Kaufman C.K. et al. GATA-3: An unexpected regulator of cell lineage determination in skin // Genes Dev. 2003. Vol. 17, № 17. P. 2108–2122.
163. Cheng X. et al. TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation // Cell. 2010. Vol. 141, № 2. P. 331–343.
164. Imura K. et al. Influence of TRPV3 mutation on hair growth cycle in mice // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. Vol. 363, № 3. P. 479–483.
165. Pallotti S. et al. Whole genome sequencing analysis of alpaca suggests TRPV3 as a candidate gene for the suri phenotype // BMC Genomics. 2024. Vol. 25, № 1. P. 185.
166. Wang L. et al. Natural phenylethanoid glycoside forsythoside A alleviates androgenetic alopecia by selectively inhibiting TRPV3 channels in mice // Eur. J. Pharmacol. Elsevier B.V., 2025. Vol. 990, № January. P. 177264.
167. Guzii A.G. et al. Pulchranin A, isolated from the Far-Eastern marine sponge, Monanchora pulchra: The first marine non-peptide inhibitor of TRPV-1 channels // Tetrahedron Lett. 2013. Vol. 54, № 10. P. 1247–1250.
168. Clapham D.E., Miller C. A thermodynamic framework for understanding temperature sensing by transient receptor potential (TRP) channels // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011. Vol. 108, № 49. P. 19492–19497.
169. O'Boyle N.M. et al. Open Babel: An Open chemical toolbox // J. Cheminform. 2011. Vol. 3, № 10. P. 33.
170. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading // J. Comput. Chem. 2010. Vol. 31, № 2. P. 455–461.
171. Combs S.A. et al. Small-molecule ligand docking into comparative models with Rosetta // Nat. Protoc. 2013. Vol. 8, № 7. P. 1277–1298.
172. Chao W.W., Lin B.F. Isolation and identification of bioactive compounds in Andrographis paniculata (Chuanxinlian) // Chin. Med. 2010. Vol. 5. P. 1–15.

173. Kumar S., Singh B., Bajpai V. Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees: Traditional uses, phytochemistry, pharmacological properties and quality control/quality assurance // J. Ethnopharmacol. Elsevier B.V., 2021. Vol. 275, № January. P. 114054.
174. Smith P.L. et al. Bisandrographolide from Andrographis paniculata activates TRPV4 channels // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281, № 40. P. 29897–29904.
175. Kalinovskii A.P. et al. Dual Modulator of ASIC Channels and GABAA Receptors from Thyme Alters Fear-Related Hippocampal Activity // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, № 17.
176. Osmakov D.I. et al. Opioid Analgesic as a Positive Allosteric Modulator of Acid-Sensing Ion Channels // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25, № 3.
177. Zhang J. et al. Molecular basis of TRPV3 channel blockade by intracellular polyamines // Commun. Biol. Springer US, 2025. Vol. 8, № 1.
178. Lubova K.I. et al. Probing temperature and capsaicin-induced activation of TRPV1 channel via computationally guided point mutations in its pore and TRP domains // Int. J. Biol. Macromol. 2020. Vol. 158. P. 1175–1183.
179. Aneiros E., Dabrowski M. Novel temperature activation cell-based assay on thermo-TRP ion channels // J. Biomol. Screen. 2009. Vol. 14, № 6. P. 662–667.
180. Zhang F. et al. Heat activation is intrinsic to the pore domain of TRPV1 // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, 2017. Vol. 115, № 2. P. E317–E324.
181. Welch J.M., Simon S.A., Reinhart P.H. The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000. Vol. 97, № 25. P. 13889–13894.
182. Yao J., Liu B., Qin F. Kinetic and energetic analysis of thermally activated TRPV1 channels // Biophys. J. Biophysical Society, 2010. Vol. 99, № 6. P. 1743–1753.
183. Cao X. et al. Divalent cations potentiate TRPV1 channel by lowering the heat activation threshold // J. Gen. Physiol. 2014. Vol. 143, № 1. P. 75–90.
184. Sánchez-Moreno A. et al. Irreversible temperature gating in trpv1 sheds light on channel activation // Elife. eLife Sciences Publications Ltd, 2018. Vol. 7. P. e36372.
185. Maltsev D.I. et al. Human TRPV1 is an efficient thermogenetic actuator for chronic neuromodulation // Cell. Mol. Life Sci. Springer, 2024. Vol. 81, № 1. P. 437.
186. Tominaga M., Tominaga T. Structure and function of TRPV1 // Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 2005. Vol. 451, № 1. P. 143–150.
187. Mugo A. et al. A suicidal mechanism for the exquisite temperature sensitivity of TRPV1 // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, 2023. Vol. 120, № 36. P. e2300305120.

188. Garami A. et al. TRPV1 antagonists that cause hypothermia, instead of hyperthermia, in rodents: Compounds' pharmacological profiles, in vivo targets, thermoeffectors recruited and implications for drug development // Acta Physiol. 2018. Vol. 223, № 3. P. 1–18.
189. Brown W. et al. Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics Study in Healthy Subjects of Oral NEO6860, a Modality Selective Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 Antagonist // J. Pain. Elsevier Inc., 2017. Vol. 18, № 6. P. 726–738.
190. Nguyen V.S. et al. Specificity and inhibitory mechanism of andrographolide and its analogues as antiasthma agents on NF-κB p50 // J. Nat. Prod. 2015. Vol. 78, № 2. P. 208–217.
191. Guan S.P. et al. Protective role of 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, a noncytotoxic analogue of andrographolide, in allergic airway inflammation // J. Nat. Prod. 2011. Vol. 74, № 6. P. 1484–1490.
192. Mack M.R., Kim B.S. The Itch–Scratch Cycle: A Neuroimmune Perspective // Trends Immunol. 2018. Vol. 39, № 12. P. 980–991.
193. Ringkamp M. et al. A role for nociceptive, myelinated nerve fibers in itch sensation // J. Neurosci. 2011. Vol. 31, № 42. P. 14841–14849.
194. Luo J. et al. Molecular and cellular mechanisms that initiate pain and itch // Cell. Mol. Life Sci. 2015. Vol. 72, № 17. P. 3201–3223.
195. Hossen M.A. et al. Effect of loratadine on mouse models of atopic dermatitis associated pruritus // Int. Immunopharmacol. 2005. Vol. 5, № 7–8. P. 1331–1336.
196. Kordulewska N.K., Król-Grzymała A. The Effect of Osthole on Transient Receptor Potential Channels: A Possible Alternative Therapy for Atopic Dermatitis // J. Inflamm. Res. 2024. Vol. 17. P. 881–898.
197. Szöllősi A.G. et al. Activation of TRPV3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes // J. Invest. Dermatol. 2018. Vol. 138, № 2. P. 365–374.
198. Zhang F., Swartz K.J., Jara-Oseguera A. Conserved allosteric pathways for activation of TRPV3 revealed through engineering vanilloid-sensitivity // Elife. 2019. Vol. 8. P. 1–19.