

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ЦИАНОПИРРОЛИДИНА НА АКТИВНОСТЬ ПРОЛИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ, ОСТРОЕ ЭКССУДАТИВНОЕ ВОСПАЛЕНИЕ И ВИСЦЕРАЛЬНУЮ БОЛЬ У МЫШЕЙ

Е.А. Иванова^{1*}, Н.Н. Золотов¹, В.Ф. Поздnev², Т.А. Воронина¹

¹Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; *эл. почта: iwanowaea@yandex.ru;

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119435, Москва, ул. Погодинская, 10

Производные цианопирролидина – бензилоксикарбонил-метионил-цианопирролидин (ZMetPrdN), бензилоксикарбонил-фенилаланил-цианопирролидин (ZPhePrdN), *трет*-бутил-оксикарбонил-глицил-цианопирролидин (BocGlyPrdN), *трет*-бутил-оксикарбонил-метионил-цианопирролидин (BocMetPrdN) – являются ингибиторами пролилэндопептидазы (ПЭП; КФ 3.4.21.26) со значениями IC_{50} от 2 нМ до 12 нМ. Соединения ZMetPrdN, ZPhePrdN и BocMetPrdN наряду с влиянием на ПЭП ингибируют и дипептидилпептидазу IV (ДПП-4; КФ 3.4.14.5) со значениями IC_{50} от 1100 нМ до 3200 нМ. На модели укусовых корчей у мышей все изучаемые соединения проявляют антиноцицептивные свойства, однако только производные цианопирролидина с ароматическими заместителями ZMetPrdN и ZPhePrdN снижают острую экссудативную воспалительную реакцию у животных. При этом в сыворотке крови мышей через три часа после индукции воспаления изучаемые производные цианопирролидина повышают активность ПЭП и компенсаторно снижают активность ДПП-4. Таким образом, один из компонентов механизма реализации антиноцицептивных и антиэкссудативных свойств изучаемых производных цианопирролидина, очевидно, обусловлен способностью соединений оказывать влияние на ПЭП.

Ключевые слова: производные цианопирролидина; пролилэндопептидаза; дипептидилпептидаза IV; воспаление; укусный перитонит; висцеральная боль

DOI: 10.18097/PBMC20206601077

ВВЕДЕНИЕ

Физиологическая роль пролилэндопептидазы (ПЭП; КФ 3.4.21.26) обусловлена как её ферментативной активностью, так и модулирующим действием за счёт непосредственного белок-белкового взаимодействия с α -тубулином, α -синуклеином и белком GAP-43 (Growth Associated Protein-43). На экспериментальных моделях показано, что ингибиторы ПЭП улучшают память и способность животных к обучению, что связывают с увеличением уровня нейроактивных пептидов-субстратов ПЭП: вещества Р, тиролиберина и аргинин-вазопрессина [1]. Известно, что на модели нейровоспаления ингибитор ПЭП KYP-2047 проявляет нейропротекторный эффект, защищая нейроны от повреждающего действия активированной микроглии и снижая уровень TNF- α , и ингибирование ПЭП при заболеваниях, протекающих с нейровоспалением (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и др.), рассматривается как одна из возможных стратегий нейропротективной терапии [2].

ПЭП является конститутивным ферментом нейтрофилов периферической крови человека, способным расщеплять коллаген с образованием нейтрофильного хемоаттрактанта пролин-глицил-пролина [3], уровень которого повышен при хроническом нейтрофильном воспалении дыхательных путей [4]. ПЭП расщепляет вещество Р (SP(1-11) с С-конца с образованием фрагментов SP(3-11), SP(5-11) и SP(8-11) [5], которые отвечают за ноцицептивный эффект вещества Р [6].

Производное цианопирролидина – бензилоксикарбонил-метионил-цианопирролидин (ZMetPrdN) – является неконкурентным ингибитором ПЭП [7] и проявляет нейропротекторную активность на модели паркинсонического синдрома, вызванного однократным системным введением мышам C57Bl/6 нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина в дозе 30 мг/кг, не влияя непосредственно на дофаминергическую систему животных [8].

Цель данного исследования – оценить влияние ZMetPrdN и 3 новых производных цианопирролидина на активность ПЭП, острое экссудативное воспаление и висцеральную боль у мышей.

МЕТОДИКА

Тест-система

Исследование выполнено на 55 самцах белых аутбредных мышей SHK массой 27-30 г. Животных получали из питомника лабораторных животных “Столбовая” (“Научный центр биомедицинских технологий”, Россия).

Объекты исследования

Объектами исследования служили бензилоксикарбонил-метионил-цианопирролидин (ZMetPrdN), бензилоксикарбонил-фенилаланил-цианопирролидин (ZPhePrdN), *трет*-бутил-оксикарбонил-глицил-цианопирролидин (BocGlyPrdN),

трет-бутил-оксикарбонил-метионил-цианопирролидин (BocMetPrdN), синтезированные при помощи стандартных методов. Структурные формулы соединений представлены на рисунке. Так как некоторые ингибиторы ПЭП ингибируют не только ПЭП, но и дипептидилпептидазу IV (ДПП-4; КФ 3.4.14.5), то для изучаемых соединений определяли значения IC_{50} как ПЭП, так и ДПП-4. Все изучаемые соединения вводили мышам однократно внутривенно (в/б) в дозе 5 мг/кг, в качестве растворителя использовали физиологический раствор. Доза изучаемых соединений выбрана на основе результатов предварительно проведённых экспериментов.

Определение IC_{50} ПЭП и ДПП-4

В эксперименте использовали производные цианопирролидина в концентрациях 0,1 мкМ; 1 мкМ; 10 мкМ и 100 мкМ. Для каждой концентрации измерения проводили в присутствии следующих концентраций субстратов Z-Ala-Pro-7-амино-4-кумариламида (для ПЭП) и Gly-Pro-7-амино-4-кумариламида (для ДПП-4): 0,006 нМ; 0,024 нМ; 0,10 нМ; 0,39 нМ; 1,25 нМ; 1,56 нМ; 6,25 нМ; 25 нМ и 100 нМ. Эксперименты проводили в трёх параллельных измерениях. Параметры ингибирования определяли в программе Prism-4 ("GraphPad Software Inc.", США).

Протокол измерения. К 20 мл раствора ферментов ПЭП или ДПП-4 (около 5 мг/мл белка) добавляли 740 мкл 0,02 М Трис-НСl (рН 8,0), 20 мкл растворов производных цианопирролидина и преинкубировали при 37°C в течение 30 мин. Затем к смеси добавляли

20 мкл раствора субстратов в диметилсульфоксиде (DMSO) и продолжали инкубировать в тех же условиях в течение 20 мин. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 20% раствора уксусной кислоты. Флуоресценцию освободившегося в процессе ферментативной реакции 4-метил-кумарил-7-амида измеряли при длине волны возбуждения 380 нм и флуоресценции 460 нм. Значения IC_{50} рассчитывали по уравнению Ченга-Пруссофа в программе Prism-4.

Тест "Укусные корчи"

Тест "Укусные корчи" (Acetic acid-induced writhing test) у мышей является моделью висцеральной боли, развивающейся после в/б введения аллогена – раствора уксусной кислоты. Висцеральная болевая реакция проявляется специфическими болевыми движениями – корчами, число которых подсчитывали на протяжении 15 мин после введения 1% раствора уксусной кислоты (в физиологическом растворе) из расчёта 1 мл раствора на 100 г массы тела животных, о наличии у соединений анальгетической активности судили по уменьшению количества корчей [9]. Введение раствора уксусной кислоты приводит к развитию острого экссудативного воспаления, выраженность которого максимальна через 3 ч после его индукции, поэтому развившийся через это время перитонит у мышей рассматривают в качестве модели острого экссудативного воспаления [10]. В проводимом нами исследовании оценено влияние изучаемых соединений как на выраженность висцеральной боли, так и на выраженность воспалительной реакции.

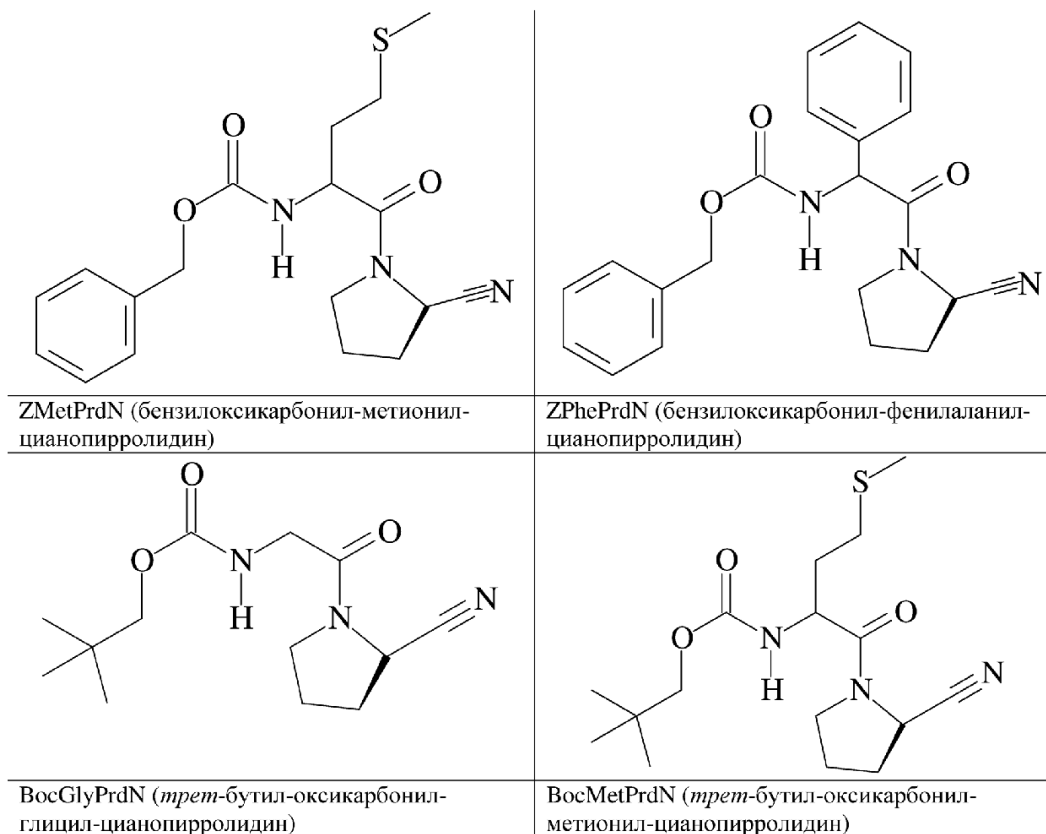


Рисунок. Структурные формулы изучаемых производных цианопирролидина.

За 40 мин до введения раствора уксусной кислоты мышам контрольных групп – группе пассивного контроля (мышам которой не вводили раствор уксусной кислоты, а вместо него вводили эквивалентный объём растворителя) и активного контроля (мышам этой группы вводили раствор уксусной кислоты) в/бр вводили растворитель – физиологический раствор в объёме 10 мл/кг массы тела. Животным опытных групп вводили изучаемые производные цианопирролидина, растворённые в физиологическом растворе, в объёме 10 мл/кг, в дозе 5 мг/кг.

В течение 15 мин после введения раствора уксусной кислоты у животных регистрировали количество корчей; через 3 ч после введения раствора уксусной кислоты мышам подвергали эвтаназии методом декапитации с помощью гильотины (НПК “Открытая Наука”, Россия), собирали кровь; далее вскрывали брюшную полость, собирали перитонеальный экссудат и регистрировали его массу, по уменьшению которой относительно контрольной группы судили о наличии у соединений антиэкссудативных свойств. Сыворотку крови получали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин на центрифуге-встряхивателе медицинской СМ-70М-07 с 36-местным универсальным угловым ротором (“ELMI Лабораторное оборудование”) и до проведения биохимического исследования хранили при температуре -20°C.

Определение активности ПЭП и ДПП-4 в сыворотке крови мышам

В сыворотке крови мышам флуориметрически определяли активность ПЭП и ДПП-4 [11]. Метод основан на определении 7-амино-4-метилкумарина, освобождающегося в процессе ферментативной реакции с пептидом Z-Ala-Pro-7-амино-4-кумариламида (для ПЭП) или с Gly-Pro-7-амино-4-кумариламида (для ДПП-4) и имеющего отличный от других пептидов спектр флуоресценции. Гидролиз субстрата регистрировали после инкубации проб при 37°C в течение 60 мин на спектрофлуориметре LS-5B (“Perkin-Elmer”, США). Количество освободившегося из субстрата 4-метил-7-аминокумарина определяли, исходя из величины флуоресценции. Удельную активность ферментов определяли по формуле:

$$A\left(\frac{\text{нмоль/мл}}{\text{мин}}\right) = \frac{E - C}{S - B} \times t'v',$$

где E – флуоресценция пробы (380/460 нм); C – флуоресценция смеси, содержащей 0,02 мл субстрата, 0,2 мл 20% уксусной кислоты и 0,005 мл сыворотки крови, 0,76 мл трис-HCl буфера (pH 8,0), содержащего 1 мМ ЭДТА-Na₂ (“Reanal”, Венгрия), дитиотреитола (“Serva”); B – флуоресценция смеси, содержащей 0,02 мл субстрата, 0,78 мл трис-HCl буфера (pH 8,0), содержащего 1 мМ ЭДТА-Na₂, 1 мМ дитиотреитола и 0,2 мл 20% уксусной кислоты; S – флуоресценция смеси, содержащей

0,02 мл субстрата, 0,78 мл трис-HCl буфера (pH 8,0), содержащего 1 мМ ЭДТА-Na₂, 1 мМ дитиотреитола, 0,2 мл 20% уксусной кислоты и 0,02 мл раствора 7-амино-4-метилкумарина (“Serva”) (2 нмоль), t – время инкубации в мин, v – объём ферментного препарата в мл.

Инкубационная смесь состояла из 0,02 мл раствора Z-Ala-Pro-MCA или Gly-Pro-MCA в DMSO (“Реахим”, Россия) с концентрацией субстрата 1 мг/мл, 0,005 мл сыворотки крови; и 0,76 мл 0,02 М трис-HCl буфера (pH 8,0), содержащего 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ ЭДТА-Na₂. Реакцию останавливали добавлением в инкубационную смесь 0,2 мл 20% уксусной кислоты [11].

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 10.0. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка с последующей оценкой равенства дисперсий по критерию Левена. В случае нормального распределения в экспериментальных группах и соблюдения межгруппового равенства дисперсий дальнейшую обработку проводили с помощью метода параметрической статистики t-критерия Стьюдента. При отсутствии нормального распределения в экспериментальных группах, либо при несоблюдении межгруппового равенства дисперсий дальнейшую обработку проводили с помощью метода непараметрической статистики Манна-Уитни. Результаты в таблицах представлены в зависимости от использования параметрических или непараметрических методов анализа данных: в случае применения параметрической статистики – как среднее ± ошибка среднего и стандартное отклонение; в случае анализа непараметрическими методами – как медиана и интерквартильный размах (25%; 75%). Различия между группами считали достоверными при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для всех исследуемых соединений значения IC₅₀ для ПЭП находились в диапазоне от 2 нМ до 12 нМ. Три из изучаемых производных цианопирролидина (ZMetPrdN, ZPhePrdN и BocMetPrdN) снижали активность ДПП-4, однако угнетение активности этого фермента было гораздо меньшим по сравнению с ингибированием ПЭП, а BocGlyPrdN не влиял на этот фермент (табл. 1).

В эксперименте на мышам в ответ на введение раствора уксусной кислоты в группе активного контроля наблюдалась выраженная висцеральная болевая реакция, которая характеризовалась 73 корчами (табл. 2). Изучаемые производные цианопирролидина значимо снижали болевую реакцию животных: производные цианопирролидина с ароматическими заместителями ZMetPrdN – на 21,9%, ZPhePrdN – на 35,9%; производные цианопирролидина с алифатическими заместителями BocGlyPrdN – на 31,5%, BocMetPrdN – на 34,3% (табл. 2).

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ЦИАНОПИРРОЛИДИНА НА ВОСПАЛЕНИЕ И БОЛЬ

Таблица 1. Показатели ингибирования пролилэндопептидазы и дипептидилпептидазы IV (IC₅₀, нМ) производными цианопирролидина

| Соединение | IC ₅₀ , нМ | |
|------------|-----------------------|------------------------|
| | Пролилэндопептидаза | Дипептидилпептидаза IV |
| ZMetPrdN | 2 | 1100 |
| ZPhePrdN | 6 | 3200 |
| BocGlyPrdN | 12 | - |
| BocMetPrdN | 3 | 1300 |

Таблица 2. Анальгетическая и противовоспалительная активность производных цианопирролидина (5 мг/кг) после превентивного однократного в/бр введения (за 40 мин) в тесте “Укусные корчи” у аутбредных мышей-самцов SHK

| Группа, количество животных в группе | Болевая чувствительность | | Экссудативное воспаление | |
|--------------------------------------|--------------------------|--|--------------------------|--|
| | Количество корчей, ед.** | % угнетения боли по сравнению с активным контролем | Масса экссудата, мг** | % угнетения воспаления по сравнению с активным контролем |
| Активный контроль, n=9 | 73,11±3,47 (10,42) | - | 826,75±48,27 (136,53) | - |
| ZMetPrdN, 5 мг/кг, n=9 | 57,11±6,55 (19,64)* | 21,9 | 692,00±29,72 (89,15)* | 16,3 |
| ZPhePrdN, 5 мг/кг, n=9 | 46,89±4,78 (14,35)* | 35,9 | 643,67±45,11 (135,34)* | 22,1 |
| BocGlyPrdN, 5 мг/кг, n=10 | 50,10±3,29 (10,41)* | 31,5 | 803,89±48,35 (145,05) | 2,8 |
| BocMetPrdN, 5 мг/кг, n=9 | 48,00±4,34 (13,03)* | 34,3 | 768,63±62,63 (177,15) | 7,0 |

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой “Активный контроль”, t-критерий Стьюдента; ** – так как распределение в экспериментальных группах было нормальным и соблюдалось межгрупповое равенство дисперсий, данные представлены как среднее ± ошибка среднего (стандартное отклонение).

Таблица 3. Влияние производных цианопирролидина на активность пролилэндопептидазы и дипептидилпептидазы IV в сыворотке крови у аутбредных мышей-самцов SHK с укусным перитонитом (нмоль×мл⁻¹×мин⁻¹)

| Группа, количество животных в группе | Активность пролилэндопептидазы** | Активность дипептидилпептидазы IV*** |
|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| Пассивный контроль, n=9 | 1,93 (1,71; 2,18) | 7,32±0,60 (1,59) |
| Активный контроль, n=9 | 1,78 (1,33; 3,00) | 9,04±0,68 (2,03) |
| ZMetPrdN, 5 мг/кг, n=9 | 3,76 (2,18; 4,19)*# | 6,58±0,33 (1,06)# |
| ZPhePrdN, 5 мг/кг, n=9 | 3,15 (2,41; 4,21)* | 6,76±0,68 (2,14)# |
| BocGlyPrdN, 5 мг/кг, n=10 | 2,75 (2,21; 3,74)* | 6,22±0,58 (1,93)# |
| BocMetPrdN, 5 мг/кг, n=9 | 2,41 (2,37; 3,18) | 5,84±0,40 (1,26)*# |

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по сравнению с группой “Пассивный контроль”, критерий Манна-Уитни/t-критерий Стьюдента; # – $p \leq 0,05$ по сравнению с группой “Активный контроль”, критерий Манна-Уитни/t-критерий Стьюдента; ** – так как нормальное распределение в экспериментальных группах отсутствовало и/или межгрупповое равенство дисперсий не соблюдалось, данные представлены как медиана и интерквартильный размах (25%; 75%); *** – так как распределение в экспериментальных группах было нормальным и соблюдалось межгрупповое равенство дисперсий, данные представлены как среднее ± ошибка среднего (стандартное отклонение).

Через 3 ч после введения раствора уксусной кислоты экссудативная реакция в брюшной полости животных группы активного контроля характеризовалась образованием 826,7 мг перитонеального экссудата. Значимое влияние на экссудацию оказывали только производные цианопирролидина с ароматическими заместителями, снижая её выраженность на 16,3% (ZMetPrdN) и 22,1% (ZPhePrdN) (табл. 2).

Через 3 ч после индукции воспаления активность ПЭП сыворотки крови в группе активного контроля значимо не отличалась от активности фермента в группе животных без экспериментальной патологии (“пассивный контроль”). Так как три изучаемых производных цианопирролидина *in vitro* обнаружили способность влиять на активность ДПП-4, у мышей с укусным перитонитом наряду

с активностью ПЭП оценивали активность ДПП-4. Хотя в группе активного контроля активность ДПП-4 была на 23,5% выше, чем в группе пассивного контроля, эти различия не достигали уровня значимости $p < 0,05$ (табл. 3).

Изучаемые производные цианопирролидина не снижали активность ПЭП в сыворотке крови мышей с укусным перитонитом, а, наоборот, повышали её. Так, ZMetPrdN увеличивал активность ПЭП в 2,1 раза по сравнению с группой активного контроля ($p = 0,05$). Активность ПЭП на фоне ZPhePrdN и BocGlyPrdN имела тенденцию к увеличению по сравнению со значением активности фермента в группе активного контроля, составлявшую, соответственно, 1,8 и 1,5 раза ($p = 0,09$, критерий Манна-Уитни). Однако по сравнению с группой животных пассивного

контроля эти три производные цианопирролидина достоверно повышали активность фермента: ZMetPrdN – в 1,9 раза, ZPhePrdN – в 1,6 раза и BocGlyPrdN – в 1,4 раза. Повышение активности ПЭП на фоне BocMetPrdN по сравнению с показателем группы пассивного контроля имело характер тенденции, соответствовавшей 24,9% ($p=0,06$) (табл. 3).

При этом все изучаемые производные цианопирролидина значимо снижали активность ДПП-4 по сравнению с группой активного контроля: ZMetPrdN – на 27,2%, ZPhePrdN – на 25,2%, BocGlyPrdN – на 31,2% и BocMetPrdN – на 35,3%. Для BocMetPrdN также зарегистрировано значимое снижение активности ДПП-4 по сравнению с группой мышей без экспериментальной патологии (“пассивный контроль”) – на 20,2% (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что все исследуемые производные цианопирролидина ZMetPrdN, ZPhePrdN, BocGlyPrdN и BocMetPrdN снижают висцеральную болевую реакцию у мышей в ответ на в/бр введение им раствора уксусной кислоты, и только производные цианопирролидина с ароматическими заместителями ZMetPrdN и ZPhePrdN способны подавлять экссудативную воспалительную реакцию у животных. *In vitro* все изучаемые соединения ингибируют ПЭП при IC_{50} от 2 нМ до 12 нМ. Субстратом ПЭП является вещество Р, при расщеплении которого образуются С-концевые метаболиты, обуславливающие его ноцицептивный эффект [6], поэтому мы предполагали, что механизм антиноцицептивного действия изучаемых производных цианопирролидина объясняется ингибированием ПЭП. Однако *in vivo* исследуемые производные цианопирролидина при в/бр введении в дозе 5 мг/кг мышам с укусным перитонитом, напротив, повышают активность ПЭП в сыворотке крови животных. При этом в сыворотке крови мышей компенсаторно снижается активность ДПП-4. В пользу компенсаторного снижения активности ДПП-4 свидетельствуют зарегистрированные *in vitro* высокие значения IC_{50} для ДПП-4 на фоне изучаемых производных цианопирролидина ZMetPrdN, ZPhePrdN и BocMetPrdN и отсутствие влияния на этот фермент BocGlyPrdN. Повышение активности ПЭП у животных с экспериментальным воспалением, наблюдаемое на фоне изучаемых соединений, предположительно, приводит к увеличению образования нейтрофильного хемоаттрактанта пролил-глицил-пролина [3]. ДПП-4 оказывает противоположное ПЭП влияние на миграцию нейтрофилов, вызывая их хеморепульсию [12]. Известно, что до 45% от общего количества белков цитозоля нейтрофилов приходится на белок S100A8/A9 [13], который при воспалении перемещается к цитоскелету и клеточной мембране [14, 15] и обуславливает антиноцицептивный эффект перитонеального экссудата мышей с острым нейтрофильным воспалением – гликогеновым перитонитом – на модели укусных корчей [16].

Максимальное повышение активности ПЭП в сыворотке крови мышей с укусным перитонитом наблюдалось при введении производных цианопирролидина с ароматическими заместителями ZMetPrdN и ZPhePrdN, на фоне которых зарегистрировано значимое снижение экссудативной воспалительной реакции. Одним из субстратов ПЭП является вазопрессин. Можно полагать, что при повышении активности ПЭП усиливается катаболизм вазопрессина, а это, в свою очередь, приводит к снижению объёма циркулирующей крови, увеличению выведения воды почками и снижению тонуса гладкой мускулатуры, следствием чего являются наблюдаемые антиэкссудативные свойства ZMetPrdN и ZPhePrdN.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Производные цианопирролидина ZMetPrdN, ZPhePrdN, BocGlyPrdN и BocMetPrdN *in vitro* ингибируют ПЭП при IC_{50} от 2 нМ до 12 нМ, при этом ZMetPrdN, ZPhePrdN и BocMetPrdN способны также ингибировать и ДПП-4 при IC_{50} от 1100 нМ до 3200 нМ. Все изучаемые соединения снижают выраженность висцеральной болевой реакции у мышей на модели укусных корчей. Однако только производные цианопирролидина с ароматическими заместителями ZMetPrdN и ZPhePrdN значимо подавляют острую экссудативную реакцию у животных. В сыворотке крови мышей с укусным перитонитом через 3 ч после индукции воспаления производные цианопирролидина повышают активность ПЭП и компенсаторно снижают активность ДПП-4.

Таким образом, производные цианопирролидина ZMetPrdN и ZPhePrdN обладают противовоспалительным и антиноцицептивным действием, BocGlyPrdN и BocMetPrdN – антиноцицептивным действием, и один из компонентов механизма реализации этих эффектов обусловлен способностью соединений оказывать влияние на ПЭП.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Организация и проведение работы с экспериментальными животными выполнялись в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами: Приказом МЗ РФ от 1 апреля 2016 г. №199н и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. Животные содержались в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)”. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике НИИ фармакологии имени В.В. Закусова (протокол №1 от 20.01.2017).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Männistö P.T., García-Horsman J.A. (2017) Front. Aging Neurosci., **9**, 27.
2. Natunen T.A., Gynther M., Rostalski H., Jaako K., Jalkanen A. (2019) Basic Clin. Pharmacol. Toxicol., **124**(1), 40-49.
3. O'Reilly P.J., Hardison M.T., Jackson P.L., Xu X., Snelgrove R.J., Gaggari A., Galin F.S., Blalock J.E. (2009) J. Neuroimmunol., **217**(1-2), 51-54.
4. O'Reilly P., Jackson P.L., Noerager B., Parker S., Dransfield M., Gaggari A., Blalock J.E. (2009) Respir. Res., **10**, 38.
5. Saidi M., Kamali S., Beaudry F. (2016) Neuropeptides, **59**, 47-55.
6. Skilling S.R., Smullin D.H., Larson A.A. (1990) J. Neurosci., **10**(4), 1309-1318.
7. Krupina N.A., Khlebnikova N.N., Zolotov N.N., Kushnareva E.Yu., Bogdanova N.G., Orlova I.N. (2013) in: Encyclopedia of Pharmacology Research. Series: Pharmacology Research, Safety Testing and Regulation (Cheng D., Liu G. eds.) Nova Science Publishers, New York, V.1, pp. 137-156.
8. Kalinina A.P., Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A. (2019) Moscow Univ. Biol. Sci. Bull., **74**(2), 69-74.
9. Воронина Т.А., Гузевых Л.С. (2012) в: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. (Миронова А.Н. и др.) Гриф и К, Москва, сс. 197-218. [Voronina T.A., Guzevych L.S. (2012) in: Guidance on preclinical study of new pharmacological substances. Part 1. (Mironova A.N. et al.) Grif and K, Moscow, pp. 197-218.]
10. Шварц Г.Я., Сябаев Р.Д. (2012) в: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. (Миронова А.Н. и др.) Гриф и К, Москва, сс. 746-758. [Shvarts G.Ya., Syubaev R.D. (2012) in: Guidance on preclinical study of new pharmacological substances. Part 1. (Mironova A.N. et al.) Grif and K, Moscow, pp. 746-758.]
11. Золотов Н.Н., Кутепова О.А., Воронина Т.А., Поздnev В.Ф., Смирнов Л.Д., Дюмаев К.М. (1991) ДАН СССР, **317**(1), 234-237. [Zolotov N.N., Kuteпова O.A., Voronina T.A., Pozdnev V.F., Smirnov L.D., Dyumaev K.M. (1991) DAN SSSR, **317**(1), 234-237.]
12. Herlihy S.E., Pilling D., Maharjan A.S., Gomer R.H. (2013) J. Immunol., **190**(12), 6468-6477.
13. Edgeworth J., Gorman M., Bennett R., Freemont P., Hogg N. (1991) J. Biol. Chem., **266**(12), 7706-7713.
14. Roth J., Burwinkel F., van den Bos C., Goebeler M., Vollmer E., Sorg C. (1993) Blood, **82**(6), 1875-1883.
15. van den Bos C., Roth J., Koch H.G., Hartmann M., Sorg C. (1996) J. Immunol., **156**(3), 1247-1254.
16. Pagano R.L., Mariano M., Giorgi R. (2006) Mediators Inflamm., **2006**(4), Article ID 36765, 1-6.

Поступила в редакцию: 05. 09. 2019.
После доработки: 06. 10. 2019.
Принята к печати: 08. 10. 2019.

EFFECT OF CYANOPYRROLIDINE DERIVATIVES ON THE ACTIVITY OF PROLYLENDOPEPTIDASE, ACUTE EXUDATIVE INFLAMMATION AND VISCERAL PAIN IN MICE

E.A. Ivanova^{1*}, N.N. Zolotov¹, V.F. Pozdnev², T.A. Voronina¹

¹Zakusov Institute of Pharmacology,

8 Baltiyskaya str., Moscow, 125315 Russia; *e-mail: iwanowaea@yandex.ru

²Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119435 Russia

Cyanopyrrolidine derivatives benzyloxycarbonyl-methionyl-cyanopyrrolidine (ZMetPrdN), benzyloxycarbonyl-phenylalanyl-cyanopyrrolidine (ZPhePrdN), *tert*-butyl-hydroxycarbonyl-glycyl-cyanopyrrolidine (BocGlyPrdN), *tert*-butyl-hydroxycarbonyl-methionyl-cyanopyrrolidine (BocMetPrdN) are inhibitors of prolylendopeptidase (PREP; EC 3.4.21.26) with an IC₅₀ of 2 nM to 12 nM. ZMetPrdN, ZPhePrdN and BocMetPrdN additionally inhibited dipeptidyl peptidase IV (DPP-4; EC 3.4.14.5) with an IC₅₀ of 1100 nM to 3200 nM. All the compounds have antinociceptive properties in the acetic acid writhing test in mice. But only cyanopyrrolidine derivatives with aromatic substituents decrease exudative inflammation. The cyanopyrrolidine derivatives also increase PREP activity and compensatorily reduce DPP-4 activity in the serum of mice three hours after the induction of inflammation. Thus, cyanopyrrolidine derivatives exhibit antinociceptive and antiexudative properties in part via their effect on PREP.

Key words: cyanopyrrolidine derivatives; prolylendopeptidase; dipeptidyl peptidase IV; inflammation; acetic acid-induced peritonitis; visceral pain

Received: 05.09.2019, revised: 06.10.2019, accepted: 08.10.2019.