

©Коллектив авторов

СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРОВ ПРОЛИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ БЕНЗИЛОКСИКАРБОНИЛ-ПРОЛИЛ-ПРОЛИНАЛЯ И БЕНЗИЛОКСИКАРБОНИЛ-МЕТИОНИЛ-ЦИАНОПИРРОЛИДИНА НА ОСТРОЕ ЭКССУДАТИВНОЕ ВОСПАЛЕНИЕ И ВИСЦЕРАЛЬНУЮ БОЛЬ У МЫШЕЙ

Е.А. Иванова*, Н.Н. Золотов, Т.А. Воронина

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

На модели перитонита у аутбредных мышей, вызванного внутрибрюшинным введением 1% раствора уксусной кислоты, ингибиторы пролилэндопептидазы (КФ 3.4.21.26), обладающие сходной ингибирующей способностью, — селективный ингибитор пролилэндопептидазы бензилоксикарбонил-пролил-пролиналь ($IC_{50} = 1,61 \pm 0,12$ нмоль/л) и неселективный ингибитор пролилэндопептидазы бензилоксикарбонил-метионил-цианопирролидин ($IC_{50} = 2,01 \pm 0,14$ нмоль/л) — при однократном внутрибрюшинном введении в дозах 2 мг/кг и 5 мг/кг проявляют сопоставимый антиэкссудативный эффект, однако только бензилоксикарбонил-метионил-цианопирролидин в дозе 5 мг/кг уменьшает болевую реакцию животных, развившуюся в ответ на введение раствора уксусной кислоты.

Ключевые слова: пролилэндопептидаза; бензилоксикарбонил-пролил-пролиналь; бензилоксикарбонил-метионил-цианопирролидин; уксусный перитонит; висцеральная боль

DOI: 10.18097/PBMC20206605423

ВВЕДЕНИЕ

Пролілэндопептидаза (ПЭП, КФ 3.4.21.26) — протеолитический фермент, специфически гидролизующий образованные остатком пролина пептидные связи с С-конца полипептидной цепи [1]. Одной из обсуждаемых в научной литературе физиологических функций ПЭП является её участие в воспалительных процессах, в том числе аутоиммунных [2-6]. Установлено, что продуктами ПЭП являются ацетилсерил-аспартил-лизил-пролин (Ac-SDKP), пролил-глицил-пролин (PGP) и его ацетилированная форма (N- α -PGP). Ac-SDKP — эндогенный ингибитор пролиферации плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток, в эксперименте на крысах Sprague-Dawley уменьшающий в левом желудочке сердца индуцированные ангиотезином II пролиферацию клеток, инфильтрацию макрофагами и тучными клетками, повышенную экспрессию трансформирующего фактора роста- β и фактора роста соединительной ткани и отложение коллагена [7]. PGP и N- α -PGP — нейтрофильные хемоаттрактанты, при воспалении образующиеся из коллагена путём его последовательного расщепления матриксными металлопротеиназами 8 или 9 и ПЭП [2-4]. Примечательно, что синтетический PGP, превентивно введённый крысам (внутримышечно) с экспериментальным экссудативным воспалением, подавляет его выраженность за счёт снижения проницаемости кровеносных сосудов в отсутствие влияния на экспрессию ЦОГ-2 [8]. Кроме того, ПЭП участвует в метаболизме ангиотензина, брадикинина и вещества Р, влияющих на Т-клеточную иммунную реакцию и миграцию антигенпрезентирующих клеток [4].

Natunen и соавт. установлено, что ингибитор ПЭП KYP-2047 дозозависимо снижает гибель нейронов и уровень TNF- α на модели нейровоспаления *in vitro* при сокультивировании мышинных первичных нейронов коры головного мозга и иммортализованных BV-2 клеток микроглии [9]. Нами было показано, что производные цианопирролидина бензилоксикарбонил-метионил-цианопирролидин (Z-Met-PrdN), бензилоксикарбонил-фенилаланил-цианопирролидин (Z-Phe-PrdN), *трет*-бутил-оксикарбонил-глицил-цианопирролидин, *трет*-бутил-оксикарбонил-метионил-цианопирролидин ингибируют ПЭП (IC_{50} от 2 нМ до 12 нМ) и уменьшают висцеральную боль у мышей в тесте “Уксусные корчи”, однако только Z-Met-PrdN и Z-Phe-PrdN проявляют способность снижать выраженность развившегося в ответ на внутрибрюшинную инъекцию раствора уксусной кислоты перитонита у животных [10].

Цель данного экспериментального исследования — оценить влияние селективного ингибитора ПЭП бензилоксикарбонил-пролил-пролиналя (Z-Pro-ProAl) на выраженность острого экссудативного воспаления и висцеральной боли у мышей в сравнении с Z-Met-PrdN.

МЕТОДИКА

Тест-система

Исследование выполнено на самцах белых аутбредных мышей SHK массой 26-30 г. Животных получали из питомника лабораторных животных “Столбовая” (Научный центр биомедицинских технологий, Россия).

Объекты исследования

Z-Pro-ProAl получен от “Sigma-Aldrich” (США), Z-Met-PrdN и используемый в дополнительном эксперименте 2-S-аланина цианопирролидин (Ala-PrdN) синтезированы и предоставлены для исследования д.х.н. В.Ф. Поздневым (НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва).

Тест “Укусные корчи”

Висцеральная болевая реакция мышей в ответ на внутрибрюшинное (в/бр) введение 1% раствора уксусной кислоты (из расчёта 1 мл раствора на 100 г массы тела) проявляется специфическими болевыми движениями — корчами; о наличии у соединений анальгетической активности судят по их способности уменьшать количество корчей. Так как в/бр введение раствора уксусной кислоты мышам приводит к развитию острого экссудативного воспаления, выраженность которого максимальна через 3 ч после его индукции, развившийся через это время перитонит рассматривают в качестве модели острого экссудативного воспаления [11].

В проводимом исследовании оценивали влияние Z-Pro-ProAl и Z-Met-PrdN на выраженность висцеральной боли и воспалительной реакции у мышей после в/бр введения раствора уксусной кислоты. За 40 мин до введения раствора уксусной кислоты мышам контрольной группы в/бр вводили растворитель — физиологический раствор — в объёме 10 мл/кг массы тела. Животным других групп вводили растворённые в физиологическом растворе (в объёме 10 мл/кг в/бр) Z-Pro-ProAl, Z-Met-PrdN в дозах 2 мг/кг и 5 мг/кг и в дополнительном опыте Ala-PrdN в дозе 5 мг/кг (дозы изучаемых соединений выбраны на основе результатов предварительно проведённых экспериментов). В течение 15 мин после введения раствора уксусной кислоты у мышей регистрировали количество корчей; через 3 ч после введения раствора уксусной кислоты мышам подвергали эктаназии методом цервикальной дислокации, вскрывали брюшную полость, собирали перитонеальный экссудат и регистрировали его массу, по уменьшению которой относительно контрольной группы судили о наличии у соединений антиэкссудативных свойств.

Определение IC_{50} ПЭП

В эксперименте использовали Z-Pro-ProAl и Z-Met-PrdN в концентрациях 0,1 мкМ, 1 мкМ, 10 мкМ и 100 мкМ. Для каждой концентрации измерения проводили в присутствии следующих концентраций субстрата Z-Ala-Pro-7-амино-4-кумариламида: 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 ПЭП (около 5 мг/мл белка) добавляли 740 мкл 0,02 М Трис-HCl (pH 8,0), 20 мкл растворов Z-Pro-ProAl и Z-Met-PrdN и преинкубировали при 37°C

в течение 30 мин. Затем к смеси добавляли 20 мкл раствора субстратов в диметилсульфоксиде 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.

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. Так как распределение в экспериментальных группах было нормальным и соблюдалось межгрупповое равенство дисперсий, дальнейшую обработку осуществляли с помощью дисперсионного анализа ANOVA с применением критерия Ньюмена-Кейлса. Результаты в таблице представлены как среднее \pm ошибка среднего (стандартное отклонение). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В проведённом эксперименте Z-Met-PrdN оказывал анальгетическое и антиэкссудативное действие. Значимое влияние соединения на выраженность висцеральной боли проявлялось при введении в дозе 5 мг/кг, что соответствовало снижению количества корчей у мышей на 36,1% по сравнению с контрольной группой; в дозе 2 мг/кг Z-Met-PrdN незначительно уменьшал болевую реакцию животных (на 14,2%, $p > 0,05$). Антиэкссудативная эффективность Z-Met-PrdN в дозах 2 мг/кг и 5 мг/кг была сопоставима: в дозе 2 мг/кг соединение снижало экссудативную реакцию на 33,3%, а в дозе 5 мг/кг — на 41,5% по сравнению с контрольной группой (таблица).

Селективный ингибитор ПЭП Z-Pro-ProAl на болевую реакцию у мышей в тесте “Укусные корчи” влияния не оказывал: на фоне его введения как в дозе 2 мг/кг, так и в дозе 5 мг/кг количество корчей у животных практически не отличалось от количества корчей в контрольной группе. Антиэкссудативный эффект Z-Pro-ProAl в обеих изучаемых дозах значимо не отличался от антиэкссудативного эффекта Z-Met-PrdN: по сравнению с контрольной группой Z-Pro-ProAl в дозе 2 мг/кг снижал массу перитонеального экссудата на 36,1%, в дозе 5 мг/кг — на 32,8% (таблица).

Z-Pro-ProAl и Z-Met-PrdN практически не различаются по способности ингибировать ПЭП (рисунок): значение IC_{50} для Z-Pro-ProAl составляет $1,61 \pm 0,12$ нмоль/л, для Z-Met-PrdN — $2,01 \pm 0,14$ нмоль/л. Поэтому разница в проявлении их действия на болевую чувствительность мышей в тесте “Укусные корчи”, очевидно, не обусловлена влиянием на этот фермент. Z-Pro-ProAl является

Таблица. Влияние бензилоксикарбонил-пролил-пролиналя (Z-Pro-ProAl) и бензилоксикарбонил-метионил-цианопирролидина (Z-Met-PrdN) при превентивном однократном внутрибрюшинном введении на болевую чувствительность и острое экссудативное воспаление у аутбредных мышей

Группа, количество животных в группе	Болевая чувствительность		Экссудативное воспаление	
	Количество корчей, ед.	% снижения боли по сравнению с контролем	Масса экссудата, мг	% снижения воспаления по сравнению с контролем
Контроль, n=9	63,13±3,51 (9,92)	-	892,00±55,56 (166,69)	-
Z-Pro-ProAl, 2 мг/кг, n=9	60,00±3,01 [#] (9,03)	5,0	569,89±45,12* (135,36)	36,1
Z-Pro-ProAl, 5 мг/кг, n=9	63,38±5,45 [#] (15,41)	-0,4	599,11±49,84* (149,53)	32,8
Z-Met-PrdN, 2 мг/кг, n=6	54,17±3,52 [#] (8,61)	14,2	595,17±47,72* (116,90)	33,3
Z-Met-PrdN, 5 мг/кг, n=7	40,33±1,54* (3,78)	36,1	522,00±40,13* (106,16)	41,5

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Ньюмена-Кейлса; # — $p < 0,05$ по сравнению с группой “Z-Met-PrdN, 5 мг/кг”, критерий Ньюмена-Кейлса.

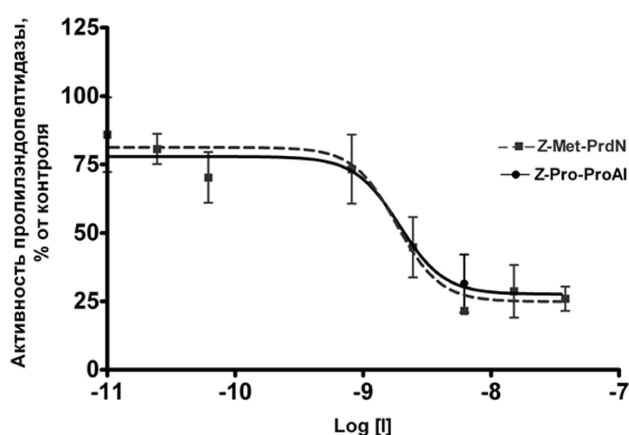


Рисунок. Влияние бензилоксикарбонил-пролил-пролиналя (Z-Pro-ProAl) и бензилоксикарбонил-метионил-цианопирролидина (Z-Met-PrdN) на активность пролилэндопептидазы.

селективным ингибитором ПЭП, а Z-Met-PrdN, кроме ПЭП, ингибирует и дипептидилпептидазу IV (ДПП-4; КФ 3.4.14.5.). Однако Z-Met-PrdN угнетает активность ДПП-4 гораздо менее выражено по сравнению с ПЭП — значение IC_{50} ДПП-4 равно 1100 нМ [10]. Несмотря на то, что при экспериментальных перитонитах у грызунов активность ДПП-4 повышена, ингибиторы ДПП-4 ситаглиптин ($IC_{50} = 25,0 \pm 9,0$ нмоль/л) и Ala-PrdN ($IC_{50} = 2,0 \pm 0,3$ нмоль/л) не способны снижать выраженность острой экссудативной реакции у мышей с укусным перитонитом [12]; и в дополнительно проведенном эксперименте на мышах в тесте “Укусные корчи” AlaPrdN при однократном в/бр введении в дозе 5 мг/кг не уменьшает болевую реакцию животных. Поэтому противоболевое действие Z-Met-PrdN не обусловлено способностью соединения ингибировать ДПП-4. Учитывая различия в химической структуре изучаемых ингибиторов ПЭП Z-Pro-ProAl и Z-Met-PrdN, можно предположить, что разница в проявлении их влияния в тесте “Укусные корчи” объясняется их фармакокинетическими свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сопоставимая антиэкссудативная эффективность селективного — Z-Pro-ProAl — и неселективного — Z-Met-PrdN — ингибиторов ПЭП, выявленная в проведенном экспериментальном исследовании на модели укусного перитонита у аутбредных мышей, обусловлена способностью этих соединений сходным образом ингибировать ПЭП. Отсутствие антиноцицептивного действия у Z-Pro-ProAl при однократном в/бр введении в дозе 5 мг/кг в тесте “Укусные корчи” у аутбредных мышей, в отличие от Z-Met-PrdN, вероятно, объясняется различием фармакокинетических свойств этих соединений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доктору химических наук, главному научному сотруднику В.Ф. Поздневу (НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича) за синтез и предоставление соединений бензилоксикарбонил-метионил-цианопирролидина и 2-S-аланина цианопирролидина для исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках государственного задания.

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. Polgar L. (1994) *Methods Enzymol.*, **244**, 188-200.
2. Gaggar A., Jackson P.L., Noerager B.D., O'Reilly P.J., McQuaid D.B., Rowe S.M., Clancy J.P., Blalock J.E. (2008) *J. Immunol.*, **180**(8), 5662-5669.
3. Henson P.M., Vandivier R.W. (2006) *Nat. Med.*, **12**(3), 280-281.
4. Penttinen A., Tenorio-Laranga J., Siikanen A., Morawski M., Roßner S., Garcia-Horsman J.A. (2011) *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **10**(3), 340-348.
5. Tenorio-Laranga J., Coret-Ferrer F., Casanova-Estruch B., Burgal M., Garcia-Horsman J.A. (2010) *J. Neuroinflammation*, **7**, Article number: 23.
6. Hashimoto Y., Kakegawa H., Narita Y., Hayakawa T., Kos J., Turk V., Katunuma N. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**(2), 334-339.
7. Rasoul S., Carretero O.A., Peng H., Cavin M.A., Zhuo J., Sanchez-Mendoza A., Brigstock D.R., Rhaleb N.E. (2004) *J. Hypertens.*, **22**(3), 593-603.
8. Бондаренко Н.С., Шнейдерман А.Н., Гусева А.А., Умарова Б.А. (2017) *Acta Naturae*, **9**(1), 52-55. [Bondarenko N.S., Shneiderman A.N., Guseva A.A., Umarova B.A. (2017) *Acta Naturae*, **9**(1), 52-55.]
9. Natunen T.A., Gynther M., Rostalski H., Jaako K., Jalkanen A. (2019) *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **124**(1), 40-49.
10. Иванова Е.А., Золотов Н.Н., Поздnev В.Ф., Воронина Т.А. (2020) *Биомедицинская химия*, **66**(1), 77-82. [Ivanova E.A., Zolotov N.N., Pozdnev V.F., Voronina T.A. (2020) *Biomeditsinskaya Khimiya*, **66**(1), 77-82.]
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. (2012) Гриф и К, Москва, 944 с. [Guidance on preclinical study of new pharmacological substances. Part 1. (2012) Grif and K, Moscow, 944 p.]
12. Иванова Е.А., Золотов Н.Н., Поздnev В.Ф., Воронина Т.А. (2018) *Патогенез*, **16**(1), 51-57. [Ivanova E.A., Zolotov N.N., Pozdnev V.F., Voronina T.A. (2018) *Patogeneez*, **16**(1), 51-57.]

Поступила в редакцию: 07. 06. 2020.
После доработки: 26. 09. 2020.
Принята к печати: 28. 09. 2020.

COMPARATIVE EFFECT OF THE PROLYL ENDOPEPTIDASE INHIBITORS, BENZYLOXYCARBONYL-PROLYL-PROLINAL AND BENZYLOXYCARBONYL-METHIONYL-CYANOPYRROLIDINE, ON THE ACUTE EXUDATIVE INFLAMMATION AND VISCERAL PAIN IN MICE

E.A. Ivanova*, N.N. Zolotov, T.A. Voronina

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

A selective prolyl endopeptidase (PEP) inhibitor benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal ($IC_{50} = 1,61 \pm 0,12$ nmol/l) and a nonselective PEP inhibitor benzyloxycarbonyl-methionyl-cyanopyrrolidine ($IC_{50} = 2,01 \pm 0,14$ nmol/l) exhibit a comparable antiexudative effect at single doses of 2 mg/kg and 5 mg/kg (intraperitoneally) in outbred mice with peritonitis induced by 1% acetic acid. However, only benzyloxycarbonyl-methionyl-cyanopyrrolidine at a dose of 5 mg/kg reduces acetic acid induced pain in animals.

Key words: prolyl endopeptidase; benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal; benzyloxycarbonyl-methionyl-cyanopyrrolidine; acetic acid-induced peritonitis; visceral pain

Funding. The study was carried out as a part of the State Assignment.

Received: 07.06.2020; revised: 26.09.2020; accepted: 28.09.2020.