

УДК 57.084.1 + 616-092.9

Активность дипептидилпептидазы IV при экссудативном воспалении у грызунов

Иванова Е.А.¹, Золотов Н.Н.¹, Позднев В.Ф.², Воронина Т.А.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В.Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича». 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8

Известно, что участие дипептидилпептидазы IV (EC 3.4.14.5, CD26, ДПП-4) в воспалительном процессе обусловлено ее влиянием на хемотаксис, пролиферацию и накопление иммунных клеток в тканях и ферментативным воздействием на ряд медиаторов воспаления. Целью данной работы являлось изучение изменения активности растворимой формы ДПП-4 при экссудативном воспалении у грызунов и оценка влияния ингибиторов ДПП-4 на его выраженность. Методы. Активность ДПП-4 в перитонеальном выпоте у крыс с моделью уксусного перитонита и мышей с моделью гликоген-индуцированного перитонита, а также в сыворотке крови крыс с моделью уксусного перитонита и с моделью вызванного каррагенаном отека лапы оценивали спектрофлуориметрически. Результаты. Установлено, что при экспериментальных перитонитах в экссудате мышей и крыс значимо увеличивается активность ДПП-4. Кроме того, при уксусном перитоните активность ДПП-4 достоверно возрастает и в сыворотке крови. У крыс с отеком лапы достоверного увеличения активности ДПП-4 в сыворотке крови не выявлено, что может быть обусловлено меньшей тяжестью воспалительного процесса. Введение мышам ингибиторов ДПП-4, отличающихся параметрами ингибирования фермента — ситаглиптина ($IC_{50} = 25,0 \pm 9,0$ нмоль/л) и AlaPrdN (2-S-аланина цианопирролидин, $IC_{50} = 2,0 \pm 0,3$ нмоль/л), не привело к достоверному изменению выраженности экссудации при уксусном перитоните у мышей. Заключение. Полученные данные позволяют полагать, что повышение активности ДПП-4 при остром экссудативном воспалении является следствием начавшегося воспалительного процесса.

Ключевые слова: активность дипептидилпептидазы IV, уксусный перитонит, гликоген-индуцированный перитонит, каррагенановый отек, крысы, мыши.

Для цитирования: Иванова Е.А., Золотов Н.Н., Позднев В.Ф., Воронина Т.А. Активность дипептидилпептидазы IV при экссудативном воспалении у грызунов. Патогенез. 2018; 16(1): 51—57

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.01.51-57

Для корреспонденции: Иванова Елена Анатольевна, e-mail: iwanowaea@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 12.12.2017

Alteration of dipeptidyl peptidase IV activity in rodents with exudative inflammation

Ivanova E.A.¹, Zolotov N.N.¹, Pozdnev V.F.², Voronina T.A.¹

¹ V.V.Zakusov Institute of Pharmacology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² V.N.Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya Str. 10, Bld. 8, Moscow 119121, Russian Federation

The role of dipeptidyl peptidase IV (EC 3.4.14.5., CD26, DPPIV) in inflammation is based on its effects on chemotaxis, proliferation, and accumulation of immune cells in tissues, and proteolysis of some inflammation mediators. The goal of this study was to evaluate the activity of soluble DPPIV in rodents with exudative inflammation and effects of DPPIV inhibitors on exudation. Methods. DPPIV activity was measured using the fluorometric assay in peritoneal exudate from rats with acetic acid-induced peritonitis and mice with glycogen-induced peritonitis as well as in serum of rats with acetic acid-induced peritonitis and carrageenan-induced paw edema. Results. The DPPIV activity was significantly increased in the exudate from mice and rats with experimental peritonitis. Furthermore, the DPPIV activity was significantly higher in blood serum of rats with acetic acid-induced peritonitis. Absence of a significant increase in the serum DPPIV activity in rats with paw edema could be due to less severe inflammation. DPPIV inhibitors with different IC_{50} , sitagliptin ($IC_{50} = 25.0 \pm 9.0$ nmol/l) and AlaPrdN (2-S-alanine cyanopyrrolidine, $IC_{50} = 2.0 \pm 0.3$ nmol/l), did not significantly change the exudation intensity in mice with acetic acid-induced peritonitis. Conclusion. The increased DPPIV activity in acute exudative inflammation results from inflammatory process onset.

Key words: dipeptidyl peptidase IV activity, acetic acid-induced peritonitis, glycogen-induced peritonitis, carrageenan-induced edema, rats, mice.

For citation: Ivanova E.A., Zolotov N.N., Pozdnev V.F., Voronina T.A. [Alteration of dipeptidyl peptidase IV activity in rodents with exudative inflammation]. Patogenez [Pathogenesis]. 2018; 16(1): 51—57 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.01.51-57

For correspondence: Ivanova Elena Anatolievna, e-mail: iwanowaea@yandex.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 12.12.2017

Введение

В организме человека дипептидилпептидаза IV (ЕС 3.4.14.5, CD26, ДПП-4) экспрессируется на мембранах иммунокомпетентных, эпителиальных и эндотелиальных клеток. Наряду с мембраносвязанной формой ДПП-4 в биологических жидкостях присутствует растворимая форма фермента, которая образуется путем протеолитического слущивания мембраносвязанной формы ДПП-4. Реализация многочисленных биологических функций ДПП-4 обеспечивается как рецепторным взаимодействием, так и ферментативной активностью данного белка [1]. Участие ДПП-4 в воспалительном процессе обусловлено влиянием ДПП-4 на хемотаксис, пролиферацию и накопление иммунных клеток в тканях, а также ферментативным воздействием на такие биологические субстраты, как провоспалительные цитокины, хемокины, вазоактивный интестинальный пептид, вещество P и нейропептид Y [2]. На клеточной линии макрофага мышей RAW264, стимулированной добавлением к культуре липополисахарида, установлено, что растворимая форма ДПП-4 усиливает экспрессию индуцибельной NO-синтазы, увеличивает выработку NO и продукцию провоспалительных цитокинов, а при ее внутривенном введении мышам линии C57BL/6J увеличивается экспрессия толл-подобных рецепторов 2 и 4 типов в почках и белой жировой ткани [3].

Однако у пациентов с такими иммунными воспалительными заболеваниями, как ревматоидный артрит, системная красная волчанка [4], болезнь Крона [5] и неспецифический язвенный колит [6] активность ДПП-4 снижается. В частности, при ревматоидном артрите наблюдается обратная корреляция между активностью ДПП-4 в сыворотке крови и тяжестью заболевания, определяемой по концентрации C-реактивного белка, количеству опухших суставов и в соответствии с суммарным индексом оценки тяжести состояния пациентов с ревматоидным артритом Disease Activity Score (DAS). При этом снижение уровня ДПП-4 в плазме крови пациентов с ревматоидным артритом тем сильнее, чем выраженнее воспалительный процесс [2].

Целью нашей экспериментальной работы явились изучение изменения активности растворимой формы ДПП-4 в воспалительном выпоте и сыворотке крови у грызунов с экссудативным воспалением и оценка влияния ингибиторов ДПП-4 на его выраженность.

Материалы и методы

Объект исследования. В работе использованы половозрелые аутбредные белые мыши-самцы массой 26–30 г и аутбредные белые крысы-самцы массой 240–260 г. Животных получали из Центрального питомника лабораторных животных РАМН («Столбовая», Московская область). Организация и проведение экспериментов осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России №199 от 1 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Животные содержались в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник

(вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Моделирование перитонита внутрибрюшинным введением гликогена у мышей. Мышам внутрибрюшинно вводили 500 мкл 5% раствора гликогена (Glycogen from oyster, туре II, Sigma-Aldrich), растворенного в физиологическом растворе [7]. Животным контрольной группы внутрибрюшинно вводили 500 мкл физиологического раствора. Через 4 часа после введения раствора гликогена или физиологического раствора мыши были подвергнуты эвтаназии путем цервикальной дислокации. После эвтаназии в брюшную полость мышей вводили 3 мл холодного натрий-фосфатного буфера (pH = 7,4), делали легкий массаж брюшной стенки и собирали перитонеальную жидкость. Супернатант перитонеальной жидкости получали центрифугированием при 5000 оборотах/мин в течение 15 минут и до проведения биохимического исследования хранили при температуре -20°C.

Моделирование перитонита внутрибрюшинным введением раствора уксусной кислоты у крыс. Перитонит у крыс вызывали внутрибрюшинным введением 1% раствора уксусной кислоты (в физиологическом растворе) из расчета 1 мл раствора на 100 г массы тела [8]. Животным контрольной группы внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Через 3 часа после введения раствора уксусной кислоты или физиологического раствора крыс подвергали эвтаназии методом декапитации и собирали кровь. В брюшную полость животных вводили по 5 мл холодного натрий-фосфатного буфера (pH = 7,4), делали легкий массаж брюшной стенки и собирали перитонеальную жидкость. Супернатант перитонеальной жидкости и сыворотку крови получали центрифугированием при 5000 оборотах/мин в течение 15 минут и до проведения биохимического исследования хранили при температуре -20°C.

Моделирование отека задней лапы крыс субплантарным введением каррагенана. Субплантарное введение 0,1 мл 1% раствора каррагенана (сульфатированного полисахарида из ирландского морского мха, Sigma-Aldrich) воспроизводит острую воспалительную реакцию — отек лапы [8]. Выраженность отека лапы регистрировали в динамике по разнице диаметра лапы (миллиметры), измеренного штангенциркулем через 1, 2, 3 и 4 часа после индукции воспаления, относительно диаметра лапы до индукции воспаления. Интактные крысы служили контрольной группой: диаметр их задних лап измеряли дважды с интервалом 1 час. Через 5 часов после введения раствора каррагенана крыс опытной и интактной групп подвергали эвтаназии методом декапитации и собирали кровь. Сыворотку крови получали центрифугированием и до проведения биохимического исследования хранили при температуре -20°C.

Определение активности ДПП-4 в сыворотке крови и перитонеальной жидкости животных. В сыворотке крови крыс с экспериментальными моделями воспаления (уксусным перитонитом и индуцированным каррагенаном отеком лапы) и перитонеальной жидкости крыс с уксусным перитонитом и мышей с индуцированным гликоге-

ном перитонитом флуориметрически определяли активность ДПП-4. Метод основан на определении освобождающегося в процессе ферментативной реакции 7-амино-4-метилкумарина. Гидролиз субстрата регистрировали после инкубации проб при 37°C на спектрофлуориметре LS-5B (Perkin-Elmer, США). Инкубация пробы при измерении активности ДПП-4 в сыворотке крови составляла 15 мин, в экссудате — 30 мин. Количество освободившегося из субстрата 4-метил-7-аминоккумарина определяли, исходя из величины флуоресценции. Удельную активность ферментов определяли по формуле:

$$A \text{ (нмоль/мл/мин)} = [(E-C)/(S-B)] \times t^{-1} \times v^{-1},$$

где E — флуоресценция пробы (380/460 нм), содержащей инкубационную смесь из 0,02 мл раствора субстрата (Gly-Pro-MCA, 1 мг/мл в DMSO) и 0,02 мл сыворотки крови или перитонеальной жидкости; и 0,76 мл 0,02 М трис-HCl буфера (pH 8,0), содержащего по 1мМ ЭДТА-Na2 и дитиотреитола. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 20% уксусной кислоты. С — флуоресценция смеси, содержащей 0,2 мл 20% уксусной кислоты, 0,02 мл субстрата и 0,02 мл сыворотки крови или перитонеальной жидкости, 0,76 мл инкубационного буфера; В — флуоресценция смеси, содержащей 0,02 мл сыворотки крови или перитонеальной жидкости, 0,78 мл инкубационного буфера и 0,2 мл уксусной кислоты; S — флуоресценция смеси, содержащей 0,02 мл субстрата, 0,76 мл инкубационного буфера, 0,2 мл 20% уксусной кислоты и 0,02 мл раствора 7-амино-4-метилкумарина (2 нмоль), t — время инкубации в мин, v — объем ферментного препарата в мл.

Определение IC₅₀ фермента ДПП-4 для ситаглиптина и AlaPrdN. В эксперименте использовали ингибиторы ДПП-4 ситаглиптин и AlaPrdN (2-S-аланина цианопирролидин) в концентрации 0,1; 1; 10 и 100 мкМ. Для каждой концентрации измерения проводили в присутствии различных концентраций субстрата Gly-Pro-AMC (0,006; 0,024; 0,10; 0,39; 1,56; 1,25; 6,25; 25 и 100 нМ). Эксперимент проведен в трех параллельных измерениях. Параметры ингибирования определяли в программе Prism-4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Протокол измерения. К 20 мкл раствора фермента добавляли 740 мкл 0,02 М Трис-HCl с pH 8,0, 20 мкл раствора AlaPrdN или ситаглиптина и преинкубировали при 37°C в течение 30 мин. Затем к смеси добавляли 20 мкл раствора субстрата в 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 7-амино-4-метилкумарина («Seriva», Германия) измеряли при длине волны возбуждения 380 нм и флуоресценции 460 нм. Значения IC₅₀ рассчитывали по уравнению Ченга-Пруссофа в программе Prism-4.

Оценка противовоспалительной активности ингибиторов ДПП-4 ситаглиптина и AlaPrdN у мышей. Противовоспалительную активность ингибиторов ДПП-4 ситаглиптина и AlaPrdN оценивали на описанной выше модели уксусного перитонита [8] у мышей. Ингибиторы ДПП-4 ситаглиптин и AlaPrdN в дозах 5 и 50 мг/кг и препарат сравнения диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг вводили животным внутрибрюшинно за 1 час до внутрибрюшинного введения 1% раствора уксусной кислоты из расчета 1 мл на 100 г массы тела. Мыши контрольной группы за 1 час до введения раствора уксусной кислоты получали

эквивалентный объем растворителя — физиологического раствора с добавлением Твина-80. Через 3 часа после индукции воспаления мышей подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации, вскрывали брюшную полость, собирали перитонеальный экссудат и регистрировали его массу, по уменьшению которой на фоне изучаемых препаратов судили о наличии у них противовоспалительных свойств.

Статистическая обработка проводилась 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 критерия Даннета. При отсутствии нормального распределения в экспериментальных группах, либо при несоблюдении межгруппового равенства дисперсий дальнейшую обработку проводили с помощью метода непараметрической статистики Манна—Уитни. Для определения статистической значимости различий повторных измерений в группе использовали парный критерий Вилкоксона. Результаты в таблицах представлены в зависимости от использования параметрических или непараметрических методов анализа: в случае применения параметрической статистики — как среднее ± ошибка среднего (M ± SE (SD)); в случае анализа непараметрическими методами — как медиана, и квартили 25% и 75% (Me (Q1; Q3)). Различия между группами считали достоверными при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

Результаты экспериментальной работы показали, что у мышей с индуцированным внутрибрюшинным введением 5% раствора гликогена перитонитом через 4 часа после индукции воспаления в перитонеальном выпоте наблюдалось достоверное увеличение активности ДПП-4 в 2,1 раза по сравнению с животными контрольной группы. У крыс с уксусным перитонитом спустя 3 часа после инъекции раствора уксусной кислоты зарегистрировано еще большее повышение активности изучаемого фермента в перитонеальном экссудате по сравнению с контрольной группой — в 7,8 раза. При этом активность ДПП-4 в сыворотке крови этих крыс возрастала не так драматично, как в экссудате — только на 39,9% (p < 0,05) (табл. 1).

Гликоген-индуцированный перитонит является моделью острого нейтрофильного воспаления [7]. Острый перитонит у крыс, вызванный внутрибрюшинным введением 1% раствора уксусной кислоты, сопровождается выходом клеток крови в экссудат с преобладанием нейтрофильного компонента [9]. Известно, что повышение концентрации ДПП-4 в сыворотке крови у людей вызывает отток нейтрофилов от зоны с повышенной концентрацией ДПП-4, и разницы концентраций ДПП-4 между противоположными поверхностями клетки, составляющей 1%, достаточно, чтобы вызвать хеморепульсию нейтрофилов [10]. Поэтому можно предположить, что зафиксированное повышение активности ДПП-4 в перитонеальном выпоте грызунов с экспериментальными нейтрофильными перитонитами обеспечивает постепенное уменьшение выраженности нейтрофильного компонента воспалительного процесса. С другой стороны, следствием

ферментативной активности растворимой формы ДПП-4 является механизм ограничения влияния пара- и аутокринных биоактивных пептидов зоной их высвобождения. Так, ограничение скопления Т-клеток в очаге повреждения при воспалении обеспечивают хемокины, уровень которых регулируется ДПП-4 [2]. Повышенная активность ДПП-4 в сыворотке крови крыс с укусным перитонитом свидетельствует о выраженной острой воспалительной реакции, протекающей с участием изучаемого фермента в воспалительных сигнальных каскадах. Известно, что при аутоиммунных заболеваниях количество циркулирующих CD26(+) клеток выше в активную фазу заболевания и снижается при иммуносупрессии разного происхождения [11].

Вызванный субплантарным введением раствора каррагенана отек лапы крыс характеризуется двухфазной воспалительной реакцией. Ранняя фаза воспалительной реакции наблюдается в течение 1 часа после введения раствора каррагенана и обусловлена выделением гистамина, серотонина, брадикинина и, в меньшей степени, простагландинов. Отставленная по времени фаза воспаления (спустя 1 час после введения раствора каррагенана) сопровождается нейтрофильной инфильтрацией и продолжающейся генерацией простагландинов [12]. Выделяемые нейтрофилами свободные радикалы, оксид азота NO и провоспалительные цитокины, такие, как фактор некроза опухоли α и интерлейкин- 1β , также вовлечены в процесс развития отставленной по времени фазы остро индуцированного раствором каррагенана воспаления лапы крыс [13].

Введение 1% раствора каррагенана в заднюю лапу крыс вызывало развитие воспалительной реакции, проявлявшейся в увеличении диаметра лапы животных, меди-

на которого через 1 час после введения раствора каррагенана соответствовала 1,74 мм. Через 2 часа после введения флогогена отечность поврежденной лапы крыс стала еще более выраженной, достоверно увеличившись относительно зарегистрированного через 1 час значения и достигнув максимума, соответствовавшего медиане, равной 2,76 мм. Относительно 2-го часа к 3-му часу эксперимента степень воспалительной реакции достоверно снизилась до значения медианы увеличения диаметра лапы, равного 1,83 мм, и после этого к 4 часу опыта практически не изменялась (табл. 2). При этом через 5 часов после индукции воспаления активность ДПП-4 в сыворотке крови крыс с индуцированным каррагенаном отеком лапы увеличивалась незначительно (на 14,7%), не достигая статистически значимого отличия с группой интактных животных. Отсутствие достоверного увеличения активности ДПП-4 в сыворотке крови крыс с индуцированным каррагенаном отеком лапы в отличие от зафиксированного достоверного возрастания активности ДПП-4 в сыворотке крови крыс с укусным перитонитом объясняется, вероятно, меньшей степенью тяжести воспалительного процесса при каррагенановом отеке по сравнению с экспериментальными моделями перитонитов.

На следующем этапе экспериментальной работы оценивали влияние ингибиторов ДПП-4, обладающих разными константами ингибирования фермента, на выраженность экссудативного воспаления. В качестве ингибиторов ДПП-4 были выбраны ситаглиптин и AlaPrdN. На рисунке показана их ингибирующая активность в отношении ДПП-4, оцененная *in vitro*. Ингибирующая активность AlaPrdN выше, чем у ситаглиптина. Значения IC_{50} , рассчитанные из уравнения Ченга—Пруссофа, находятся

Таблица 1

Активность ДПП-4 при экспериментальном перитоните у мышей и крыс

Группа	Активность ДПП-4 (нмоль \times мл ⁻¹ \times мин ⁻¹)		
	Гликогеновый перитонит у мышей: перитонеальный. Выпот, M \pm SE (SD)	Укусный перитонит у крыс	
		Перитонеальный выпот, Me (Q1; Q3)	Сыворотка крови M \pm SE (SD)
Контроль, физиологический раствор	n = 10 0,63 \pm 0,10 (0,30)	n = 9 2,32 (2,25; 3,52)	n = 9 12,78 \pm 1,39 (4,18)
Животные с перитонитом	n = 10 1,30 \pm 0,10 (0,31)*	n = 10 18,14 (6,35; 20,22) #	n = 10 17,88 \pm 1,72 (5,43)*

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Даннета; # — $p = 0,002$ по сравнению с контрольной группой, критерий Манна—Уитни

Таблица 2

Активность ДПП-4 в сыворотке крови крыс с индуцированным каррагенаном отеком лапы

Группа	Увеличение диаметра поврежденной лапы, мм (Me (Q1; Q3)), на фоне введения каррагенана через:				Активность ДПП-4 (нмоль \times мл ⁻¹ \times мин ⁻¹) в сыворотке крови
	1 час	2 часа	3 часа	4 часа	
Интактные животные	n = 6 0,00 (-0,02; 0,10)				n = 6 13,25 \pm 1,47 (3,60)
Животные с каррагенановым отеком лапы	n = 9 1,72 (1,36; 2,04) * #	n = 9 2,76 (2,30; 2,92) *	n = 9 1,82 (1,46; 1,94) * #	n = 9 1,96 (1,80; 2,14) *	n = 8 15,20 \pm 1,41 (3,72)

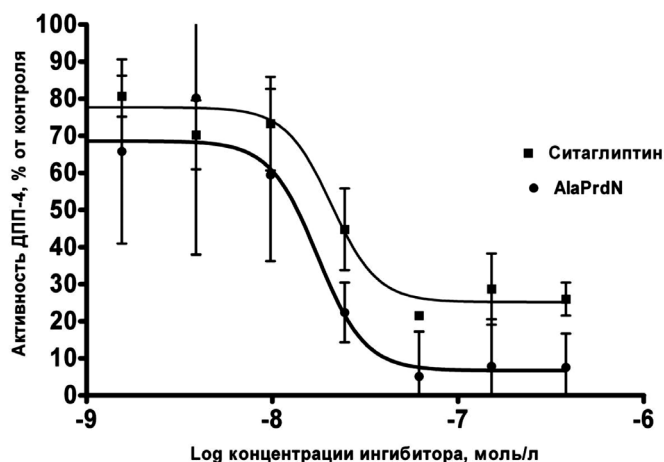
Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с группой интактных животных, критерий Манна—Уитни; # — $p < 0,05$ по сравнению с увеличением диаметра поврежденной лапы через 2 часа после введения раствора каррагенана, парный критерий Вилкоксона

для соединения AlaPrdN в диапазоне $2,0 \pm 0,3$ нмоль/л, а для ситаглиптина — $25,0 \pm 9,0$ нмоль/л.

С учетом того, что на стрептозотоциновой модели диабета у крыс ситаглиптин в дозе 5 мг/кг проявлял выраженный гипогликемический эффект, повышая уровень инкретинов и инсулина в плазме крови [14], эта доза была выбрана для введения животным в эксперименте по оценке влияния ситаглиптина на экссудативное воспаление. Второй изучаемой дозой ситаглиптина была взята десятикратно ее превышающая (50 мг/кг). AlaPrdN также вводили животным в дозах 5 и 50 мг/кг.

Внутрибрюшинное введение 1% раствора уксусной кислоты вызывало у мышей воспалительную реакцию, которая характеризовалась образованием 560,0 мг экссудата в брюшной полости. Изучаемые ингибиторы ДПП-4 не оказывали достоверного влияния на образование воспалительного выпота в брюшной полости у животных. Ситаглиптин в дозах 5 и 50 мг/кг незначительно уменьшал степень экссудации соответственно на 10,1% и 15,9%; AlaPrdN в дозе 50 мг/кг недостоверно снижал количество образовавшегося воспалительного выпота на 17,2% (табл. 3). При этом препарат сравнения диклофенак натрия при введении мышам внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг достоверно уменьшал массу воспалительного экссудата на 37,0% по сравнению с контрольной группой (табл. 3).

Известны противовоспалительные свойства ингибиторов ДПП-4, проявляющиеся в понижении содержания провоспалительных маркеров цитокинов IL-1 β и TNF- α в почках предрасположенных к ожирению и сахарному диабету II типа крыс линии Цукер [15]; предупреждением инфильтрации жировой ткани CD8+ Т-клетками и M1 макрофагами и снижением экспрессии ингибитора активатора плазминогена (PAI-1) у линейных Gck $^{+/-}$ мышей, диета которых включала комбинацию сахарозы и линолевой кислоты [16]; уменьшением экспрессии мРНК IL-6, TNF- α и IL-12 в жировой ткани и экспрессии мРНК MCP-1, IL-6, IL-12 и ИФН- γ индуцируемого протеина 10 в островках Лангерганса у мышей C57Bl/6J с экспериментальной моделью ожирения [17]; угнетением воспалительных процессов в стенке сосудов и подавлением за счет этого образования неинтимы бедренной артерии у линейных мышей с отсутствующим рецептором к липопротеину низкой плотности [18]. Описанные выше противовоспалите-



Влияние ситаглиптина и AlaPrdN на активность дипептидилпептидазы IV *in vitro*.

льные свойства ингибиторов ДПП-4 выявлены у линейных животных с метаболическими нарушениями. В проведенном нами эксперименте использовались аутбредные мыши без метаболических нарушений с острой воспалительной реакцией — уксусным перитонитом. Учитывая, что при уксусном перитоните у крыс наблюдалось выраженное повышение активности ДПП-4 как в перитонеальном выпоте, так и в сыворотке крови, и ингибиторы ДПП-4 с отличающимися константами ингибирования ситаглиптин и AlaPrdN не оказывали достоверного влияния на образование воспалительного выпота в брюшной полости животных, можно предположить, что повышение активности ДПП-4 при экссудативном воспалении является следствием происходящих при воспалении патологических процессов. В частности, ДПП-4 является аденозиндезаминазу (ЕС 3.5.4.4, АДА) связывающим белком, поэтому, вероятно, повышение активности ДПП-4 сопровождается изменением активности АДА, участие которой в развитии воспалительного процесса обсуждается. Так, в синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом активность АДА повышена [19], и противовоспалительный эффект антифолатной терапии ревматоидного артрита метотрексатом отчасти объясняется увеличением внеклеточной концентрации аденозина [20].

Таблица 3

Влияние ингибиторов ДПП-4 на выраженность экссудации при уксусном перитоните у мышей

Группы	Масса экссудата, мг Me (Q1; Q3)
Контроль, уксусный перитонит	n = 7 560,0 (535,0; 620,0)
Диклофенак натрия, 10 мг/кг	n = 7 353,0 (302,0; 364,5) *
Ситаглиптин, 5 мг/кг	n = 7 503,5 (435,8; 525,5)
Ситаглиптин, 50 мг/кг	n = 10 471,0 (397,5; 602,5)
AlaPrdN, 5 мг/кг	n = 10 587,5 (435,0; 764,5)
AlaPrdN, 50 мг/кг	n = 10 463,5 (431,5; 697,5)

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Манна—Уитни.

Заключение

В сыворотке крови крыс и перитонеальном выпоте крыс и мышей с экспериментальными моделями острой экссудативной реакции — укусным и гликоген-индуцированным перитонитами, — характеризующимися выраженным нейтрофильным компонентом, зарегистрирована повышенная активность ДПП-4, которая может рассматриваться маркером воспалительного процесса. В сыворотке крови крыс с отеком лапы, вызванным введением каррагенана, при котором также наблюдается нейтрофильная инфильтрация тканей, достоверного повышения активности ДПП-4 не зарегистрировано, что может быть обусловлено меньшей выраженностью воспалительной реакции. Ввиду того, что ингибиторы ДПП-4 ситаглиптин и AlaPrdN, значительно отличающиеся параметрами ингибирования фермента (IC_{50} для ситаглиптина составляет $25,0 \pm 9,0$ нмоль/л, для AlaPrdN — $2,0 \pm 0,3$ нмоль/л), не оказали значимого влияния на экссудативную реакцию у мышей с укусным перитонитом, мы считаем повышение активности ДПП-4 при остром экссудативном воспалении следствием начавшегося воспалительного процесса. С одной стороны, рост активности ДПП-4 может приводить к постепенному уменьшению выраженности нейтрофильного компонента воспалительного процесса [10]. С другой стороны, следствием ферментативной активности растворимой формы ДПП-4 является механизм ограничения влияния пара- и аутокринных биоактивных пептидов зоной их высвобождения: хемокины, уровень которых регулируется ДПП-4, ограничивают скопление Т-клеток очагом воспаления [2]. Кроме того, ДПП-4 является АДА связывающим белком, поэтому увеличение активности изучаемого фермента может сопровождать также и возрастание ферментативной активности АДА и, вследствие этого, снижение внеклеточной концентрации аденозина, проявляющего противовоспалительные свойства [20]. Полученные нами экспериментальные данные, наряду с результатами описанных в литературе исследований, свидетельствуют о неоднозначной и многокомпонентной роли ДПП-4 при воспалении, требующей дальнейшего изучения каскадов воспалительных реакций, в которых может участвовать этот фермент.

Список литературы

1. Локшина Л.А. Протеиназы плазматической мембраны лимфоидных клеток и их биологическая функция. *Биоорганическая химия*. 1998; 24(5): 323-331.
2. Sedo A., Duke-Cohan J.S., Balaziová E., Sedova L.R. Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologs: contributing factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res. Ther.* 2005; 7(6): 253-269. DOI: 10.1186/ar1852
3. Lee D.S., Lee E.S., Alam M.M., Jang J.H., Lee H.S., Oh H., Kim Y.C., Manzoor Z., Koh Y.S., Kang D.G., Lee D.H. Soluble DPP-4 up-regulates toll-like receptors and augments inflammatory reactions, which are ameliorated by vildagliptin or mannose-6-phosphate. *Metabolism*. 2016; 65(2): 89-101. DOI: 10.1016/j.metabol.2015.10.002
4. Hagihara M., Ohhashi M., Nagatsu T. Activities of dipeptidyl peptidase II and dipeptidyl peptidase IV in mice with lupus erythematosus-like syndrome and in patients with lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Clin. Chem.* 1987; 33(8): 1463-1465.
5. Rose M., Hildebrandt M., Flieg H., Seibold S., Monnikes H., Klapp B.F. T-cell immune parameters and depression in patients with Crohn's disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 2002; 34(1): 40-48.
6. Hildebrandt M., Rose M., Ruter J., Salama A., Monnikes H., Klapp B.F. Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD 26) in patients with

inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2001; 36(10): 1067-1072.

7. Pagano R.L., Mariano M., Giorgi R. Neutrophilic cell-free exudate induces antinociception mediated by the protein S100A9. Mediators of Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2006. 2006(4): 36765. DOI: DOI: 10.1155/MI/2006/36765

8. Шварц Г.Я., Сюбаев Р.Д. *Методические рекомендации по доклиническому изучению нестероидных противовоспалительных лекарственных средств*. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К; 2012. 746-758.

9. Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Умарова Б.А., Копылова Г.Н., Гончарова Е.Л., Багликова К.Е. Исследование противовоспалительных свойств глипролинов на экспериментальной модели острого перитонита у крыс. *Цитокины и воспаление*. 2008; 2: 28-32.

10. Herlihy S.E., Pilling D., Maharjan A.S., Gomer R.H. Dipeptidyl peptidase IV is a human and murine neutrophil chemorepellent. *J. Immunol.* 2013; 190(12): 6468-6477. DOI: 10.4049/jimmunol.1202583

11. De Meester I., Korom S., Van Damme J., Scharpé S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol. Today*. 1999; 20(8): 367-375.

12. Gilligan J.P., Lovato S.J., Erion M.D., Jeng A.Y. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. *Inflammation*. 1994; 18(3): 285-292.

13. Halici Z., Dengiz G.O., Odabasoglu F., Suleyman H., Cadirci E., Halici M. Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: An experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 566: 215-221. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.03.046

14. Островская Р.У., Золотов Н.Н., Озерова И.В., Иванова Е.А., Капица И.Г., Тарабан К.В., Мичунская А.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А., Середин С.Б. Ноопепт восстанавливает показатели инкретиновой системы при моделировании диабета у крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014; 157(3): 321-327. DOI: DOI: 10.1007/s10517-014-2562-5

15. Marques C., Mega C., Gonzalves A., Rodrigues-Santos P., Teixeira-Lemos E., Teixeira F., Fontes-Ribeiro C., Reis F., Fernandes R. Sitagliptin prevents inflammation and apoptotic cell death in the kidney of type 2 diabetic animals. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 538737. DOI: 10.1155/2014/538737

16. Shirakawa J., Fujii H., Ohnuma K., Sato K., Ito Y., Kaji M., Sakamoto E., Koganei M., Sasaki H., Nagashima Y., Aoki K., Morimoto C., Takeda E., Terauchi Y. Diet-induced adipose tissue inflammation and liver steatosis are prevented by DPP-4 inhibition in diabetic mice. *Diabetes*. 2011; 60(4): 1246-1257. DOI: 10.2337/db10-1338

17. Dobrian A.D., Ma Q., Lindsay J.W., Leone K.A., Ma K., Cobben J., Galkina E.V., Nadler J.L. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin reduces local inflammation in adipose tissue and in pancreatic islets of obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011; 300(2): E410-E421. DOI: 10.1152/ajpendo.00463.2010

18. Akita K., Isoda K., Shimada K., Daida H. Dipeptidyl-peptidase-4 inhibitor, Alogliptin, attenuates arterial inflammation and neointimal formation after injury in low-density lipoprotein (LDL) receptor-deficient mice. *J. Am. Heart Assoc.* 2015, 4(3): e001469. DOI: 10.1161/JAHA.114.001469

19. Nakamachi Y., Koshiba M., Nakazawa T., Hatachi S., Saura R., Kurosaka M., Kusaka H., Kumagai S. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 668-74. DOI: 10.1002/art.10956

20. Cronstein B.N., Naime D., Ostad E. The antiinflammatory effects of methotrexate are mediated by adenosine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994, 370: 411-6.

References

1. Lokshina L.A. [Plasma membrane proteases of lymphoid cells and their biological functions]. *Bioorganicheskaya himiya. [Bioorganic Chemistry]*. 1998; 24(5): 323-331. (in Russian)
2. Sedo A., Duke-Cohan J.S., Balaziová E., Sedova L.R. Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologs: contributing factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res. Ther.* 2005; 7(6): 253-269. DOI: 10.1186/ar1852
3. Lee D.S., Lee E.S., Alam M.M., Jang J.H., Lee H.S., Oh H., Kim Y.C., Manzoor Z., Koh Y.S., Kang D.G., Lee D.H. Soluble DPP-4 up-regulates toll-like receptors and augments inflammatory reactions, which are ameliorated by vildagliptin or mannose-6-phosphate. *Metabolism*. 2016; 65(2): 89-101. DOI: 10.1016/j.metabol.2015.10.002

4. Hagihara M., Ohhashi M., Nagatsu T. Activities of dipeptidyl peptidase II and dipeptidyl peptidase IV in mice with lupus erythematosus-like syndrome and in patients with lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Clin. Chem.* 1987; 33(8): 1463-1465.
5. Rose M., Hildebrandt M., Flieg H., Seibold S., Monnikes H., Klapp B.F. T-cell immune parameters and depression in patients with Crohn's disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 2002; 34(1): 40-48.
6. Hildebrandt M., Rose M., Ruter J., Salama A., Monnikes H., Klapp B.F. Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD 26) in patients with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2001; 36(10): 1067-1072.
7. Pagano R.L., Mariano M., Giorgi R. Neutrophilic cell-free exudate induces antinociception mediated by the protein S100A9. Mediators of Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2006. 2006(4): 36765. DOI: DOI: 10.1155/MI/2006/36765
8. Shvarts G.Ya., Syabaev R.D. [Methodological instructions on the study of new nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: Guidance on preclinical study of new pharmacological substances]. Part 1. Ed. by A.N.Mironov. M. Grif and K; 2012: 746-758. (in Russian)
9. Bakaeva Z.V., Samonina G.E., Umarova B.A., Kopylova G.N., Goncharova E.L., Baglikova K.E. [A study of anti-inflammatory properties of glyprolines using experimental model of the acute peritonitis in rats]. *Citokiny i vospalenie. [Cytokines and inflammation]*. 2008; 2: 28-32. (in Russian)
10. Herlihy S.E., Pilling D., Maharjan A.S., Gomer R.H. Dipeptidyl peptidase IV is a human and murine neutrophil chemorepellent. *J. Immunol.* 2013; 190(12): 6468-6477. DOI: 10.4049/jimmunol.1202583
11. De Meester I., Korom S., Van Damme J., Scharpff S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol. Today.* 1999; 20(8): 367-375.
12. Gilligan J.P., Lovato S.J., Erion M.D., Jeng A.Y. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. *Inflammation.* 1994; 18(3): 285-292.
13. Halici Z., Dengiz G.O., Odabasoglu F., Suleyman H., Cadirci E., Halici M. Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: An experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 566: 215-221. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.03.046
14. Ostrovskaya R.U., Zolotov N.N., Ozerova I.V., Ivanova E.A., Kapitsa I.G., Taraban K.V., Michunskaya A.M., Voronina T.A., Gudasheva T.A., Sereidenin S.B. [Noopept normalizes parameters of the incretin system in rats with experimental diabetes]. *Byulleten' ehksperimentalnoi biologii i mediciny [J]*. 2014; 157(3): 321-327. DOI: DOI: 10.1007/s10517-014-2562-5 (in Russian)
15. Marques C., Mega C., Gonzalves A., Rodrigues-Santos P., Teixeira-Lemos E., Teixeira F., Fontes-Ribeiro C., Reis F., Fernandes R. Sitagliptin prevents inflammation and apoptotic cell death in the kidney of type 2 diabetic animals. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 538737. DOI: 10.1155/2014/538737.
16. Shirakawa J., Fujii H., Ohnuma K., Sato K., Ito Y., Kaji M., Sakamoto E., Koganei M., Sasaki H., Nagashima Y., Amo K., Aoki K., Morimoto C., Takeda E., Terauchi Y. Diet-induced adipose tissue inflammation and liver steatosis are prevented by DPP-4 inhibition in diabetic mice. *Diabetes.* 2011; 60(4): 1246-1257. DOI: 10.2337/db10-1338
17. Dobrian A.D., Ma Q., Lindsay J.W., Leone K.A., Ma K., Cobben J., Galkina E.V., Nadler J.L. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin reduces local inflammation in adipose tissue and in pancreatic islets of obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011; 300(2): E410-E421. DOI: 10.1152/ajpendo.00463.2010
18. Akita K., Isoda K., Shimada K., Daida H. Dipeptidyl-peptidase-4 inhibitor, Alogliptin, attenuates arterial inflammation and neointimal formation after injury in low-density lipoprotein (LDL) receptor-deficient mice. *J. Am. Heart Assoc.* 2015, 4(3): e001469. DOI: 10.1161/JAHA.114.001469
19. Nakamachi Y., Koshiba M., Nakazawa T., Hatachi S., Saura R., Kurosaka M., Kusaka H., Kumagai S. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase I in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 668-74. DOI: 10.1002/art.10956
20. Cronstein B.N., Naime D., Ostad E. The antiinflammatory effects of methotrexate are mediated by adenosine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994, 370: 411-6.

Сведения об авторах

Иванова Елена Анатольевна — кандидат фармацевтических наук, старший научный сотрудник лаборатории психофармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В.Закусова»

Золотов Николай Николаевич — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории психофармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В.Закусова»

Поздnev Владимир Федорович — доктор химических наук, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича»

Воронина Татьяна Александровна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией психофармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В.Закусова»