

МИКРОПЛАНШЕТНЫЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ ФОСФАТАЗЫ PTP1B*

Д.А. Бабков^{1,2}, Е.В. Соколова¹, А.А. Бригадирова^{1,3}, О.Ю. Захарьящева¹

¹ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии и биоинформатики;

²Лаборатория фармакологии антиоксидантных средств НИИ фармакологии ВолгГМУ;

³ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», лаборатория экспериментальной фармакологии

Физиологическими регуляторами действия инсулина являются процессы фосфорилирования и дефосфорилирования инсулинового рецептора (ИР). Действие инсулина может ингибироваться благодаря действию ряда протеинтирозинфосфатаз (РТР), которые катализируют быстрое дефосфорилирование рецептора и его субстратов по остаткам фосфотирозина. Ингибирование цитоплазматической фосфатазы PTP1B является перспективным направлением поиска новых лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа.

Ключевые слова: диабет 2-го типа, протеинтирозинфосфатаза, ингибиторы, инсулин.

DOI 10.19163/1994-9480-2019-2(70)-81-83

MICROTITER PLATE METHOD FOR IDENTIFICATION OF PTP1B PHOSPHATASE INHIBITORS

D.A. Babkov^{1,2}, E.V. Sokolova¹, A.A. Brigadirova^{1,3}, O.Yu. Zakharyashcheva¹

¹FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation, Department of Pharmacology and Bioinformatics;

²Laboratory of Pharmacology of Antioxidant Agents, Research Institute of Pharmacology of Volgograd State Medical University;

³SBI «Volgograd Medical Scientific Centre», Laboratory of Experimental Pharmacology

Insulin action is physiologically regulated by phosphorylation and dephosphorylation of insulin receptor (IR). The action of insulin can be inhibited due to the action of a number of protein tyrosine phosphatases (PTP), which catalyze the rapid dephosphorylation of the receptor and its substrates on phosphotyrosine residues. Inhibition of cytoplasmic phosphatase PTP1B is a promising direction the search for new drugs for the treatment of type 2 diabetes.

Key words: type 2 diabetes, protein tyrosine phosphatase, inhibitors, insulin.

Физиологическими регуляторами действия инсулина являются процессы фосфорилирования и дефосфорилирования инсулинового рецептора (ИР). Сигнальный путь инсулина может ингибироваться благодаря действию ряда протеинтирозинфосфатаз (РТР), которые катализируют быстрое дефосфорилирование рецептора и его субстратов по остаткам фосфотирозина. Первостепенную роль в этом процессе играет цитоплазматическая фосфатаза PTP1B. У нокаутных по PTP1B мышей наблюдалось ускорение процессов фосфорилирования по тирозиновым остаткам в ИР и субстратах ИР в скелетной мускулатуре и повышенная чувствительность к инсулину [8]. Ингибирование цитоплазматической фосфатазы PTP1B является перспективным направлением поиска новых лекарственных средств для терапии СД 2-го типа [1].

На экспериментальных моделях сахарного диабета (СД) 1-го и 2-го типов производные ванадия продемонстрировали выраженные инсулиномиметические и антидиабетические свойства [5], механизм которых связывают с ингибированием протеинтирозинфосфатаз, в том числе PTP1B – фермента, который участвует в дефосфорилировании ИР, провоцируя развитие инсулинорезистентности [6].

У животных с моделями СД 1-го и 2-го типа терапия производными ванадия приводит к стимулированию глюкозо-индуцированной секреции инсулина, увеличению поглощения глюкозы тканями и их чувствительности к инсулину, а также уменьшению продукции глюкозы печенью [10].

Среди потенциальных ингибиторов PTP1B выделяют соединение JTT-551. Так, при пероральном введении JTT-551 у мышей с генетической моделью ожирения линии ob/ob и с сахарным диабетом линии db/db улучшался метаболизм глюкозы, предположительно, благодаря усилению инсулиновой сигнализации [2]. При хроническом введении JTT-551 у мышей с ожирением, индуцированным высококалорийной диетой, происходило снижение веса и нормализация метаболизма липидов и глюкозы [3]. В результате ряда экспериментальных исследований на моделях *in vitro* выяснили, что флавоноид морин является неконкурентным ингибитором PTP1B, а также стимулирует фосфорилирование ИР и активацию сигнального пути Akt/PKB; помимо указанных молекулярных эффектов морин ингибирует глюконеогенез и повышает синтез гликогена в печени [7].

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-415-343004).

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оптимизация метода определения активности РТР1В в микропланшетном формате для поиска новых низкомолекулярных ингибиторов фермента.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и оборудование. Активность РТР1В (рекомбинантная человеческая полной длины, Sigma SRP0215) определяли по гидролизу нитрофенилфосфата (pNPP, Sigma N4645) до хромофора *p*-нитрофенола (pNP) с помощью ридера Infinite M200 Pro (Tecan, Австрия) при длине волны 405 нм. Исследуемые вещества получены от к. х. н. О. Н. Жуковской из НИИ ФОХ ЮФУ (г. Ростов-на-Дону).

Построение калибровочной кривой. Приготовленные растворы стандарта (pNP) в 11 концентрациях от 120 нМ до 0,71 нМ (серия 1,67 кратных разведений) вносили в 96-луночный планшет по 100 мкл в четырех повторах и измеряли поглощение при длине волны 405 нм.

Определение кинетических параметров реакции. В качестве буферного раствора использовали 50 мМ Трис-Cl (pH 7.5 при 24 °C) с 150 мМ NaCl, 3 мМ ДТТ и 0,1 мг/л БСА. В 96-луночный планшет вносили по 40 мкл субстрата каждой концентрации (20 мМ, 8 мМ, 3,2 мМ, 1,28 мМ и 0,512 мМ) в четырех повторах. Во все лунки добавили 10 мкл буфера, содержащего 1 % ДМСО. Реакцию запускали добавлением 50 мкл 1,2 мкг/мл раствора РТР1В [4]. После запуска реакции измеряли поглощение при 405 нм с 30-секундными интервалами в течение 15 минут. Полученную оптическую плотность пересчитывали на количество образовавшегося в лунке продукта реакции по калибровочной кривой. Скорость реакции определяли по наклону линейного участка и использовали для расчета V_{max} и K_m по уравнению Михаэлиса–Ментена.

Скрининг ингибиторов РТР1В. Вносили в 96-луночный планшет 40 мкл 5 мМ pNPP. В опытные лунки добавляли 10 мкл ингибитора в двух повторах (конечная концентрация 100 мкМ). В качестве отрицательного контроля использовали 10 мкл 1% ДМСО в буфере (так же, как и в опытных лунках). Реакцию инициировали добавлением 50 мкл 1,2 мкг/мл раствора РТР1В. Оптическую плотность при длине волны 405 нм измеряли сразу после запуска реакции и через 20 минут инкубации в термошейкере при 30 °C.

Обработка результатов выполняется в программе GraphPad Prism 7.0 или Microsoft Excel 2010 с расчетом базовых статистических показателей: среднего арифметического M , стандартного отклонения SD , стандартной ошибки среднего арифметического SEM . Анализ зависимости «доза-эффект» проводится с использованием метода нелинейной регрессии и расчета значений параметра IC_{50} .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Необходимую концентрацию субстрата (pNPP) определили по графику Михаэлиса–Ментена.

В программе GraphPad Prism 7 построили график зависимости оптической плотности от концентрации *p*-нитрофенола (рис. 1).

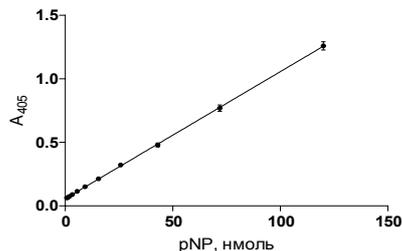


Рис. 1. Калибровочная кривая. График зависимости *p*-нитрофенола от оптической плотности при $\lambda = 405$ нм. Линейная регрессия $Y = 0,009999 \cdot X + 0,05648$; $R^2 = 0,999$

Для серии 2,5-кратных разведений субстрата построили график: количество, образованного pNP (нмоль) в реакции от времени в секундах (рис. 2). Скорость протекания реакции определяли как наклон линии регрессии.

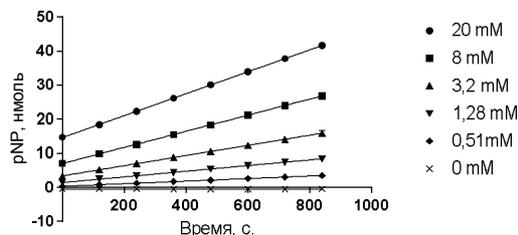


Рис. 2. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата. Наклон линии регрессии для 20 мМ субстрата составляет 0,03152, 8 мМ — 0,02348, 3,2 мМ — 0,01496, 1,28 мМ — 0,007989, 0,512 мМ — 0,003847 и в холостой без субстрата наклон равен 0,000009091

Определив скорости реакции, построили график Михаэлиса–Ментена (рис. 3). Константа Михаэлиса составила 5,237 мМ.

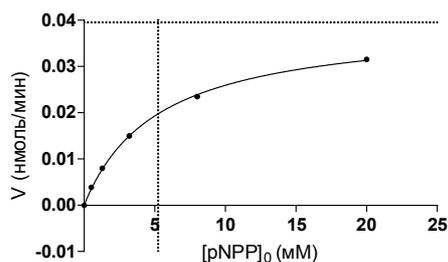


Рис. 3. Кинетика реакции по уравнению Михаэлиса–Ментена. На графике пунктирной линией отмечены $V_{max} = 0,0395$, $K_m = 5,237$ мМ

Чтобы оценить качество методики, рассчитали показатели: сигнал-шум и Z-фактор. Отношение сигнал/шум составило 65,6. Z-фактор рассчитали по формуле:

$$Z = 1 - \frac{3 \cdot (\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|},$$

где σ_p и σ_n — стандартные отклонения положительного и отрицательного контроля; μ_p и μ_n — средние значения положительного и отрицательного контроля.

$Z < 0$ неприемлемо; $0 \leq Z < 0,5$ означает среднее качество; $0,5 \leq Z < 1$ – отличное качество; $Z = 1$ – идеальный показатель [9]. В использованных нами условиях Z-фактор равен 0,79.

Отработанная методика была использована для проведения скрининга гетероциклических производных как ингибиторов РТР1В (рис. 4).

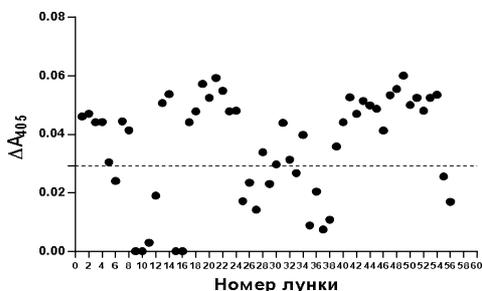


Рис. 4. Скрининг бифенильных производных на ингибирующую активность РТР1В *in vitro*. Изучение новых веществ производили в дуплетах.

На графике показаны значения прироста оптической плотности за 20 мин после инкубации.

Пунктирная линия – значение прироста оптической плотности, при котором показатель ингибирования равен 50%.

Наиболее активные соединения расположены под линией

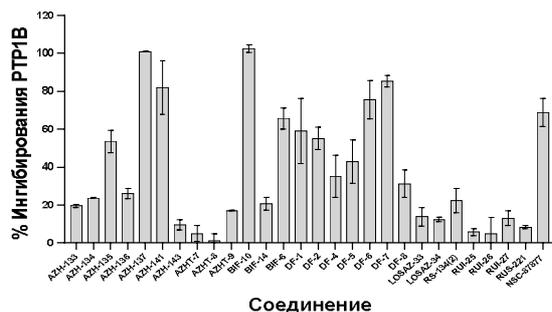
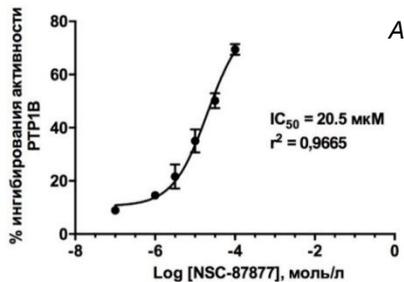


Рис. 5. Ингибирующая активность новых производных бифенила в концентрации 100 мкМ.

Пунктирная линия – процент ингибирования вещества сравнения NSC-87877

В результате скрининга 27 производных бифенила выявили 5 соединений, превышающих по ингибирующей активности вещество сравнения в концентрации 100 мкМ (рис. 5).

Отобранные соединения изучили в концентрационной зависимости (рис. 6). Соединение под шифром BIF-10 оказалось наиболее активным и по значению IC_{50} сопоставимо с препаратом сравнения.



Контактная информация

Бабков Денис Александрович – к. х. н., старший преподаватель кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, с. н. с. лаборатории фармакологии антиоксидантных средств НИИ фармакологии ВолгГМУ; e-mail: denis.a.babkov@gmail.com

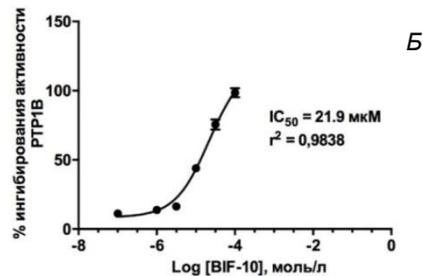


Рис. 6. РТР1В-ингибирующая активность соединений: А – NSC-87877, Б – BIF-10

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате данного исследования подобрали концентрацию р-нитрофенилфосфата по графику Михаелиса–Ментена. Оценкой оптимальных условий проведения реакции послужили значения сигнал/шум и Z-фактор. На основании выбранных условий провели скрининг *in vitro* новых производных бифенила. Найдены активные соединения под шифром BIF-10, AZH-137, AZH-141, DF-6, DF-7. Активность соединения BIF-10 по значению IC_{50} была близка к таковой у вещества сравнения NSC-87877.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Extension J., Road S. PTP1B inhibitors for type 2 diabetes treatment : a patent review (2011–2014) // *Expert. Opin. Ther. Pat.* – 2014.
2. Furuta Y., Horiguchi M., Soguro E., Otani M., Sakai M., Masui Y., Tsuchida A., Sato Y., Takubo K., Hochigai H., Kimura H., Nakahira H., Nakagawa T., Tajiri M. Chronic administration of DSP-7238, a novel, potent, specific and substrate-selective DPP IV inhibitor, improves glycaemic control and beta-cell damage in diabetic mice // *Diabetes Obes Metab.* – 2010. – № 12. – P. 421–430.
3. Ito M., Fukuda S., Sakata S., Morinaga H., Ohta T. Pharmacological Effects of JTT-551, a Novel Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitor, in Diet-Induced Obesity Mice // *J. Diabetes Res.* – 2014.
4. Lubben T., Clampit J., Stashko M., Trevillyan J., Jirousek M.R. In vitro enzymatic assays of protein tyrosine phosphatase 1B // *Curr. Protoc. Pharmacol.* – 2001. – Chapter 3, Unit 3.8. doi:10.1002/0471141755.ph0308s13.
5. Iyyam S., Pillai S., Kandaswamy M. A novel insulin mimetic vanadium e fl avonol complex: Synthesis, characterization and *in vivo* evaluation in STZ-induced rats // *Eur. J. Med. Chem.* – 2013. – № 63. – P. 109–117. doi:10.1016/j.ejmech.2013.02.002.
6. Korbecki J., Baranowska-bosiacka I., Gutowska I., Chlubek D. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. – 2012. – P. 195–200.
7. Paoli P., Giannoni E., Chiarugi P. Biochimica et Biophysica Acta Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression // *BBAMCR.* – 2013. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.026.
8. Saltiel A.R. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes // *Cell.* – 2001. – № 104. – P. 517–529. doi:10.1016/S0092-8674(01)00239-2.
9. Zhang J., Chung T.D.Y., Oldenburg K.R. Journal of Biomolecular Screening. – 1999. doi: 10.1177/ 108705719900400206.
10. Zorzano A., Palacín M., Martí L., García-vicente S. Arylalkylamine vanadium salts as new anti-diabetic compounds // *J. Inorg. Biochem.* – 2009. – № 103. – P. 559–566. doi:10.1016/j.jinorgbio.2009.01.015.