

**А. С. Таран, Н. И. Чепляева**

Волгоградский государственный медицинский университет,  
кафедра фармакологии

## МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ДИПЕПТИДИЛПЕПТИДАЗА-4 ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ *IN VITRO*

УДК 574.785.5:616.379-008.64

В данной работе оценивается влияние вилдаглиптина и ситаглиптина на активность дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4) спектрофотометрическим и флуориметрическим методами с использованием плазмы крови и рекомбинантного фермента. По результатам исследования оба метода могут применяться для скрининга веществ с ДПП-4 ингибиторной активностью.

*Ключевые слова:* ДПП-4 ингибиторная активность, ситаглиптин, вилдаглиптин, гипогликемические лекарственные средства.

**A. S. Taran, N. I. Cheplyayeva**

## METHODS OF ASSESSING THE *IN VITRO* INHIBITING ACTIVITY OF DIPEPTIDYLPEPTIDASE-4

The objective of this study was to assess the effect of vildagliptin and sitagliptin on the activity of dipeptidylpeptidase-4 by the methods of spectrophotometry and fluorometry using blood plasma and recombinant enzyme. The study showed that both methods can be used for screening substances with dipeptidylpeptidase-4.

*Key words:* dipeptidylpeptidase-4 inhibiting activity, sitagliptin, vildagliptin, hypoglycemic drugs.

В Российской Федерации, как и во всем мире, продолжается прогрессирующее нарастание распространенности сахарного диабета 2-го типа (СД2). Необходима разработка эффективного терапевтического алгоритма сахароснижающего лечения, позволяющего достичь компенсации углеводного обмена и предупредить развитие тяжелых сосудистых осложнений этого заболевания. При выборе терапевтических средств приоритетом является эффективность сахароснижающего действия в сочетании с безопасностью препаратов для пациентов [4]. В терапии сахарного диабета 2-го типа в клинической практике используют – диетотерапию, пероральные сахароснижающие препараты, на конечных этапах – инсулин [1].

Пероральные сахароснижающие препараты подразделяются на группы по способу их воздействия на патогенез сахарного диабета. Исходя из этого, выделяют: препараты, снижающие резистентность тканей к инсулину (инсулинсенситайзеры) [(бигуаниды (метформин) и тиазолидиндионы (росиглитазон, пиоглитазон)]; препараты, усиливающие секрецию инсулина [препараты сульфонилмочевины и несульфонилмочевинные глиниды (натеглинид, репаглинид)]; препараты, подавляющие всасывание углеводов в желудочно-кишечном тракте (ингибиторы альфа-глюкозидазы) [2].

В последнее время в терапевтической практике активно применяются препараты, действие которых основано на инкретиновом

эффекте. К ним относятся два класса препаратов: агонисты глюкагоноподобного пептида (ГПП-1) – эксенатид, лираглутид и ингибиторы дипептидилпептидазы типа 4 (ДПП-4), разрушающие ГПП-1 – ситаглиптин, вилдаглиптин, саксаглиптин. В связи с тем, что агонисты ГПП-1 существуют только в инъекционных формах, это значительно усложняет использование их в клинической практике, поэтому предпочтительными в терапии диабета являются пероральные лекарственные средства – ингибиторы ДПП-4 [3].

Дипептидилпептидазы – ферменты семейства сериновых пептидаз, которые широко распространены во многих тканях (почки, кишечник, печень, селезенка, плацента, надпочечники, лимфоциты, эндотелиальные клетки). Наиболее близкими по ферментативной функции из представителей олигопептидаз являются ДПП-4, ДПП-8 и ДПП-9. При неселективном ингибировании ДПП-4, ДПП-8 и ДПП-9 Lankas было отмечено проявление токсичности у грызунов и собак: алопеция, тромбоцитопения, ретикулоцитопения, увеличение селезенки, мультиорганные гистопатологические изменения и смертность [8]. Однако данные оспаривались дальнейшими исследованиями Burkey и др. Эксперименты, в которых ДПП-8 и ДПП-9 были выборочно ингибированы, в естественных условиях не приводили к проявлениям токсичности. В связи с этим было рекомендовано отвергнуть связь действия этих ферментов с проявлениями побочных эффектов [6].

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить влияние вилдаглиптина и ситаглиптина на активность дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4) спектрофотометрическим и флуориметрическими методами.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящее время для определения ДПП-4 ингибирующей активности существует множество различных методов. В качестве источника фермента используется либо рекомбинантный фермент ДПП-4, либо плазма человека [10]. При спектрофотометрическом исследовании субстратом реакции является Гли-Про-р-нитроанилид, при флуориметрическом исследовании в качестве субстрата используют Gly-Pro-AMC [7].

Необходимой является оптимизация методов для поиска новых веществ с высокой селективностью. В данной работе рассмотрим два метода оценки ДПП-4 ингибиторной активности – спектрофотометрический и флуориметрический.

**Спектрофотометрический метод.** Для оценки ингибиторной активности на плазме человека смешивали 10 мкл раствора ситаглиптина или вилдаглиптина (конечная концентрация 1, 10, 100, 1000 нМ) с 50 мкл 0,1 М Трис-НСI буфер с рН 8,4 и 40 мкл плазмы человека. Анализируемую смесь преинкубировали при 37 °С в течение 5 мин. После преинкубации вносили 100 мкл 1 мМ субстрата реакции Гли-Про-р-нитроанилида (Sigma, США), полученную смесь инкубировали при 37 °С в течение 15 мин. Развитие желтого окрашивания в результате высвобождения 4-нитроанилина определяли при 405 нм, используя прибор для считывания планшетов (ELx800, BioТес, США) [11].

При исследовании ДПП-4-ингибиторной ферментной активностью на рекомбинантном ферменте на первом этапе исследований проводили подбор количества рекомбинантного фермента, необходимого для реакции, и время инкубации реакционной смеси. Для этого готовили преинкубационный раствор общим объемом 250 мкл, который включал 0,1 М Трис-НСI буфер с рН 8,4, 7,5 или 15 мкл раствора фермента ДПП-4 (recombinant, expressed in Sf9 cells, 0,2 ЕД/мл) (Sigma, США). Данную смесь инкубировали при 37 °С в течение 30 мин, далее вносили 10 мкл 1,4 мМ субстрата реакции Гли-Про-р-нитроанилида (Sigma, США). Полученную смесь инкубировали при 37 °С, через 15, 30, 45, 60 мин и определяли оптическую плотность при 405 нм. Для оценки активности фермента ДПП-4 ингибирующей активности рассчитывали концентрацию, образовавшегося р-нитроанилина [11].

На втором этапе исследований оценивали ингибирующую активность известных препаратов с ДПП-4 ингибирующей активностью. Преинкубационный раствор объемом 250 мкл, включал 0,1 М Трис-НСI буфер с рН 8,4,

7,5 мкл раствора фермента ДПП-4 (0,2 ЕД/мл) и тестируемые препараты в концентрации 1, 10, 100, 1000 нМ. В тест-системе исследовали вилдаглиптин (Novartis Pharma, Швейцария) и ситаглиптин (Merck Sharp & Dohme, Нидерланды). Данную смесь преинкубировали при 37 °С в течение 30 мин, далее вносили 10 мкл 1,4 мМ субстрата реакции Гли-Про-р-нитроанилида. Полученную смесь инкубировали при 37 °С, через 60 мин определяли оптическую плотность при 405 нм [12].

**Флуориметрический метод.** Для измерения ингибирования ДПП-4 с помощью флуориметрического анализа использовался субстрат Gly-Pro-AMC (Sigma, США), который под действием фермента расщепляется с образованием флуоресцирующего продукта, 4-метилкумарил-7-амида (AMC). К 40 мкл исследуемого вещества (ситаглиптин или вилдаглиптин) добавляли 40 мкл плазмы крови человека и 1480 мкл 0,02 М Трис-НСI буфера с рН 8,0. Полученную смесь преинкубировали 30 минут при температуре 37 °С, затем добавляли 40 мкл субстрата в концентрации 2 мкМ и инкубировали 20 минут при температуре 37 °С. Останавливали реакцию путем добавления 400 мкл 20%-го раствора уксусной кислоты. Образование AMC проверяли на спектрофлуориметре MPF-400 (Hitachi, Япония), используя длину волны возбуждения 380 нм и длину волны эмиссии 460 нм [6].

Величину ингибирования рассчитывали по следующей формуле:

$$(\text{контроль} - \text{тест}/\text{контроль}) \times 100 \%$$

Значения IC50 подсчитывали, используя Graphit 4.0.15 (Erithacus Software, Ltd, UK). Для статистического и графического представления полученных результатов использовали пакет программ Prizm 4 (Graph Pad Software, Inc.).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ДПП-4 входит в состав суперсемейства пролилолигопептидаз, члены которого избирательно расщепляют связь X-Про и X-Ала в дипептидах (где X – любая аминокислота, кроме пролина) и отличается от других пролилолигопептидаз наличием двух глутаминовых остатков в каталитическом кармане, которые необходимы для биологической активности фермента [5]. ДПП-4-подобная активность характерна для ряда других ферментов, включая белок активации фибробластов  $\alpha$ , ДПП-8, ДПП-9, дипептидилпептидазу IV  $\beta$ , дипептидиламинопептидазу-подобный белок, N-ацетилированную  $\alpha$ -связанную кислотную дипептидазу, пролиндипептидазу покоящихся клеток, дипептидилпептидазу II, аттрактин. Данные ферменты формируют так называемую «DASH» группу на основе протеинов с ДПП-4 ферментативной активностью и с или без структурной гомологии [3]. Плазма человека может

использоваться в качестве источника ДПП-4 и ДПП-4-подобных ферментов и исследования ингибиторной активности соединений.

При исследовании способности известных препаратов (вилдаглиптин, ситаглиптин)

ингибировать ДПП-4 и гомологичные ферменты плазмы крови человека спектрофотометрическим методом, выявлено, что зависимость «доза – эффект» носила сигмовидный характер (рис. 1).

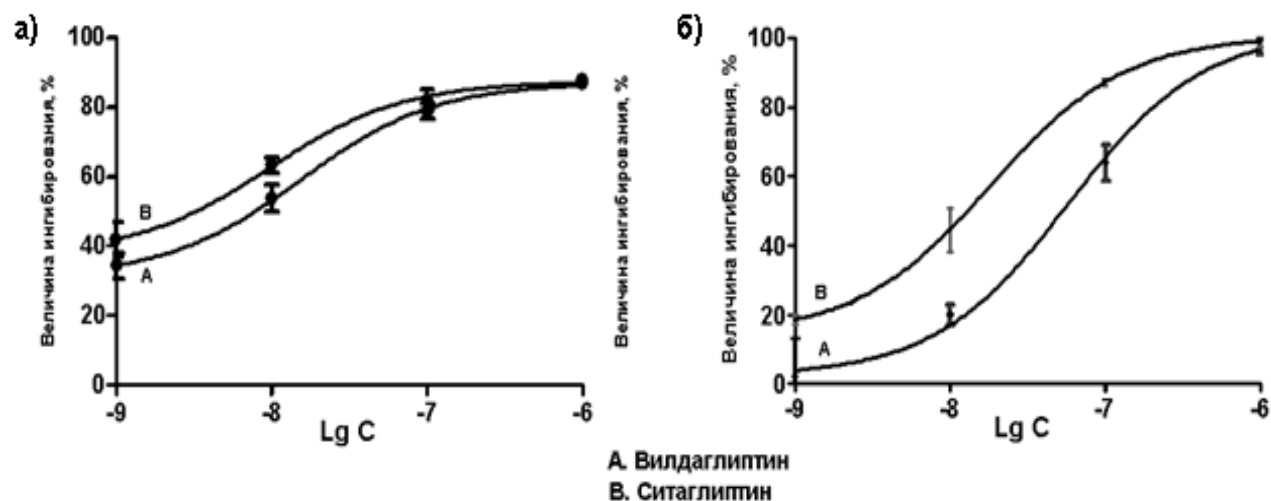


Рис. 1. ДПП-4 ингибирующая активность вилдаглиптина и ситаглиптина (спектрофотометрия): а – плазма человека; б – рекомбинантный фермент

Следует отметить, что при увеличении концентрации препаратов выше 1000 нМ величина ингибирования колебалась в пределах 80–85 %, так как в данной тест-системе присутствует не только ДПП-4, но и ферменты с аналогичной активностью, на которые вилдаглиптин и ситаглиптин не оказывают действия, вследствие высокой селективности. Величина ИК50 для вилдаглиптина составила 15,35 нМ (7,79–30,27 нМ, 95 % С.І), а для ситаглиптина равна 9,63 нМ (4,28–21,69 нМ, 95 % С.І).

На следующем этапе исследования было установлено, что увеличение концентрации рекомбинантного фермента в два раза приводит к повышению количества продукта реакции р-нитроанилина почти в два раза во все временные промежутки. С увеличением времени

инкубации, происходит нарастание концентрации р-нитроанилина, так к 30-й минуте в три раза, затем темпы прироста снижаются к 45-й минуте в 1,6 раза, а к 60-й минуте – в 1,3 раза.

Далее в данной тест-системе были протестированы известные ингибиторы ДПП-4, вилдаглиптин и ситаглиптин. Выявлена нелинейная зависимость «доза – эффект», показатель ИК50 для вилдаглиптина составил 58,16 нМ (34,23–98,83 нМ, 95 % С.І), а для ситаглиптина был несколько выше и равен 18,35 нМ (10,95–98,83 нМ, 95 % С.І).

Используя флуориметрический метод для определения ДПП-4 ингибирующего действия ситаглиптина и вилдаглиптина, установлена зависимость «доза – эффект», имеющая сигмовидный характер (рис. 2).

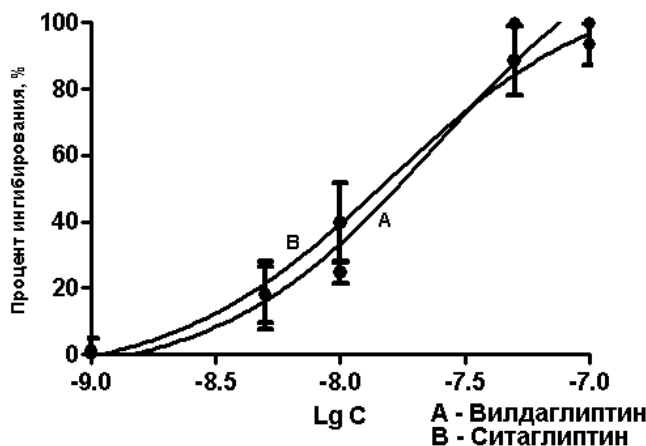


Рис. 2. ДПП-4 ингибирующая активность вилдаглиптина и ситаглиптина в плазме человека (флуориметрия)

В концентрации препаратов выше 1000 нМ величина ингибирования колебалась в пределах 92–99,7 %.

В данной тест-системе были протестированы известные ингибиторы ДПП-4, вилдаглиптин и ситаглиптин, показатели ИК50 для которых составили 24,67 нМ (13,49–44,91 нМ, 95 % С.І) и 15,63 нМ (5,32–45,63 нМ, 95 % С.І) соответственно.

Данные, полученные на рекомбинантном ферменте, согласуются с результатами исследований Thomas L. и др. (2008), согласно которым ИК50 для ситаглиптина 19 нМ, вилдаглиптина – 62 нМ [11].

Таким образом, данные спектрофотометрические и флуориметрические методы определения ДПП-4 ингибиторной активности могут использоваться для оценки эффективности новых соединений. Целесообразно проводить первичный скрининг на плазме человека, а далее оценивать величину ингибирования в тест-системе с рекомбинантным ферментом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спектрофотометрический и флуориметрический методы определения ДПП-4 ингибиторной активности отвечают основным критериям, по которым оценивают методики исследования – точность, воспроизводимость и чувствительность, вследствие чего могут успешно применяться для поиска и скрининга новых высокоактивных соединений с ДПП-4 ингибирующей активностью. А спектрофотометрический метод

высокоспецифичен и избирателен при использовании рекомбинантного фермента.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аметов А. С. Сахарный диабет 2 типа. Основы патогенеза и терапии. – М., 2003.
2. Аметов А. С., Демидова Т. Ю., Доскина Е. В. и др. Алгоритм диагностики и управления сахарным диабетом 2 типа. Клинические рекомендации для практикующих врачей. – М., 2007.
3. Бова Е. В., Пакус Е. Н. // Фундаментальные исследования. – 2009. – С. 6–9.
4. Дедов, И. И. Эндокринология: учебник / И. И. Дедов, Г. А. Мельниченко, В. В. Фадеев. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 432 с.
5. Gupta R., Walunj S. S., Tokala R. K., et al. // Curr. Drug. Targets. – 2009. – № 10(1). – P. 71–87.
6. Lankas George R., Leiting B., Beconi Maria G. // DIABETES. – 2005. – Vol. 54.
7. Matheussen V, Lambeir A.-M., Jungraithmayr W., et al. // Method comparison of dipeptidyl peptidase IV activity assays and their application in biological samples containing reversible inhibitors. – 2011. – P. 456–462.
8. Pospisilik J. A., Stafford S. G., Demuth H. U., et al. // Zucker rat. – 2002. – № 51(9). – P. 2677–2683.
9. Sedo A., Duke-Cohan J. S., Balaziová E., et al. // Arthritis. Res. Ther. – 2005. – № 7(6). – P. 253–269.
10. Sigma-Aldrich. Enzymatic Assay of Dipeptidyl Peptidase IV (EC 3.4.14.5), SSGPNA01, 2006 Revised: 08/26/99:1-2. Sigma-Aldrich. St. Louis; 2006.
11. Thomas L., Eckhardt M., Langkopf E., et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2008. – № 325(1). – P. 175–182.
12. Yogisha S., Raveesha K. A. // Journal of Natural Products. – 2010. – № 3. – P. 76–79.