
ФАРМАКОЛОГИЯ, ТОКСИКОЛОГИЯ

Н. И. Чепляева, Е. С. Воробьев

Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии

ИНГИБИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ НА РАЗЛИЧНЫЕ САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ

УДК 615.31:615.252.349.7

Проведено сравнительное исследование активности ингибиторов различных сайтов гликогенфосфорилазы: каталитического сайта, DAB (IC₅₀ – 49,41 мкМ); пуринового сайта, кофеин (IC₅₀ – 720 мкМ) и кверцетин (IC₅₀ – 15,69 мкМ); индолкарбоксамидного сайта, CP-316819 (IC₅₀ – 1,24 мкМ). Помимо этого, выявлено, что ингибиторы двух различных сайтов связывания CP-316819 и кофеин, оказывают синергетический эффект, как в низких, так и в высоких концентрациях.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, гликогенфосфорилаза, ингибиторы гликогенфосфорилазы, каталитический сайт, пуриновый сайт, аллостерический АМФ сайт, индол-связывающий сайт.

N. I. Cheplyaeva, E. S. Vorobiev

INHIBITORY ACTIVITY OF SPECIFIC LIGANDS FOR DIFFERENT BINDING SITES OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE

We compared the activity of glycogen phosphorylase inhibitors with different binding sites including a catalytic site, DAB (IC₅₀ – 49,41 mcM), a purine binding site, caffeine (IC₅₀ – 750 mcM) and quercetin (IC₅₀ – 15,69 mcM), indole site, CP-316819 (IC₅₀ – 1,24 mcM). Along with this, we found that inhibitors of two different binding sites (CP-316819 and caffeine) exert a synergistic effect both with a low and a high concentration.

Keywords: diabetes mellitus type 2, glycogen phosphorylase, glycogen phosphorylase inhibitors, catalytic site, purine site, allosteric AMP site, indole site.

Сахарный диабет (СД) 2-го типа представляет собой заболевание с нарушением углеводного обмена, проявляющийся инсулинорезистентностью, нарушением функции поджелудочной железы и повышением продукции глюкозы печенью [2]. Центральную роль в гомеостазе глюкозы выполняет печень, заключающаяся в способности печени контролировать продукцию глюкозы печенью (ПГП) [1]. Повышение продукции глюкозы печенью является одним из ведущих факторов в патогенезе СД и требует дополнительной фармакологической коррекции. Один из основных метаболических процессов, сопровождающихся повышенной ПГП при СД 2-го типа является гликогенолиз. Гликогенфосфорилаза (ГФ) – ключевой регуляторный фермент в процессе распада гликогена до глюкозы [5, 11].

ГФ является димерным ферментом состоящим из двух субъединиц, каталитически активной

формой ГФа и каталитически не активной формой ГФб [10].

У данного фермента существует несколько сайтов связывания для фармакологических лигандов: каталитический сайт; аллостерический сайт АМФ; кофеин-связывающий ингибирующий сайт (связывает пуриновые нуклеозиды); сайт хранения гликогена; индолкарбоксамидный аллостерический сайт; сайт связывания с бензимидазолами [8, 15].

В результате исследований были выявлены группы соединений и их производные, имеющие ГФ ингибирующую активность к определенному сайту связывания. Например, ингибиторы каталитического сайта представлены соединениями на основе глюкозы [14]. Основными представителями ингибиторами кофеин-связывающего сайта являются пурины, флавоноиды, индирубины, а также кофеин [9], а индолкарбоксамидного сайта – производные индола [12].

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-25-00139).

ГФ на данный момент является одной из мишеней для создания новой группы препаратов в терапии СД 2-го типа.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Апробировать тест системы и сравнить ингибиторы ГФ, выстраивающиеся в различные сайты связывания.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы следующие соединения: CP-316819 (Sigma США), кверцетин (Sigma США), 1,4-дидеокси-1,4-имино-D-арабинола гидрохлорид (DAB) (Sigma США) и кофеин (Sigma США). Данные вещества были исследованы в диапазоне концентрация от 10^{-4} до 10^{-7} . Для оценки ГФ ингибиторной активности *in vitro* 100 мкл 50 мМ NERES буфера с pH 7,2 содержащего 100 мМ хлорид калия, 2,5 мМ хлорид магния, 0,5 мМ глюкозо-1-фосфата (Sigma, США), 1 мг/мл гликогена, преинкубировали с мышечной гликогенфосфорилазой α кролика (Sigma, США) и исследуемыми соединениями при 30 °C 30 минут. После преинкубации количество высвобожденного неорганического фосфата измеряли через 20 минут после добавления 150 мкл 1 М раствора HCl, содержащего 10 мг/мл молибдата аммония и 0,38 мг/мл малахитового зеленого. Развитие окрашивания оценивали при 630 нм, используя прибор для считывания планшетов (Infinite M200, Tecan, Австрия) [17].

Для определения ингибирующей концентрации (IC50) соединения в 14 % ДМСО добавляли в реакционную смесь, при этом в контрольную смесь без ингибитора вносили ДМСО в аналогичной концентрации.

Статистическую обработку данных проводили с использованием U-критерий Манна-Уитни с использованием пакета программ Graphit 4.0.15 (Erithacus Software, Ltd, UK).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ингибирование гликогенолиза является одним из перспективных фармакологических подходов в терапии СД 2-го типа. ГФ снижает распад гликогена и повышает продукцию глюкозы печенью, а также воздействует на один из основных патогенетических факторов, что позволяет корректировать гипергликемию и не приводит к гипогликемии [3, 4]. В данной работе было проведено исследование соединений ингибиторов ГФ, связывающихся с различными сайтами, кофеин, кверцетин, CP-316819, DAB. Активность данных соединений описана во многих литературных источниках [6, 13], однако изучали их с использованием различных методологических подходов. При выполнении данной работы все соединения исследовались в одной тест системе.

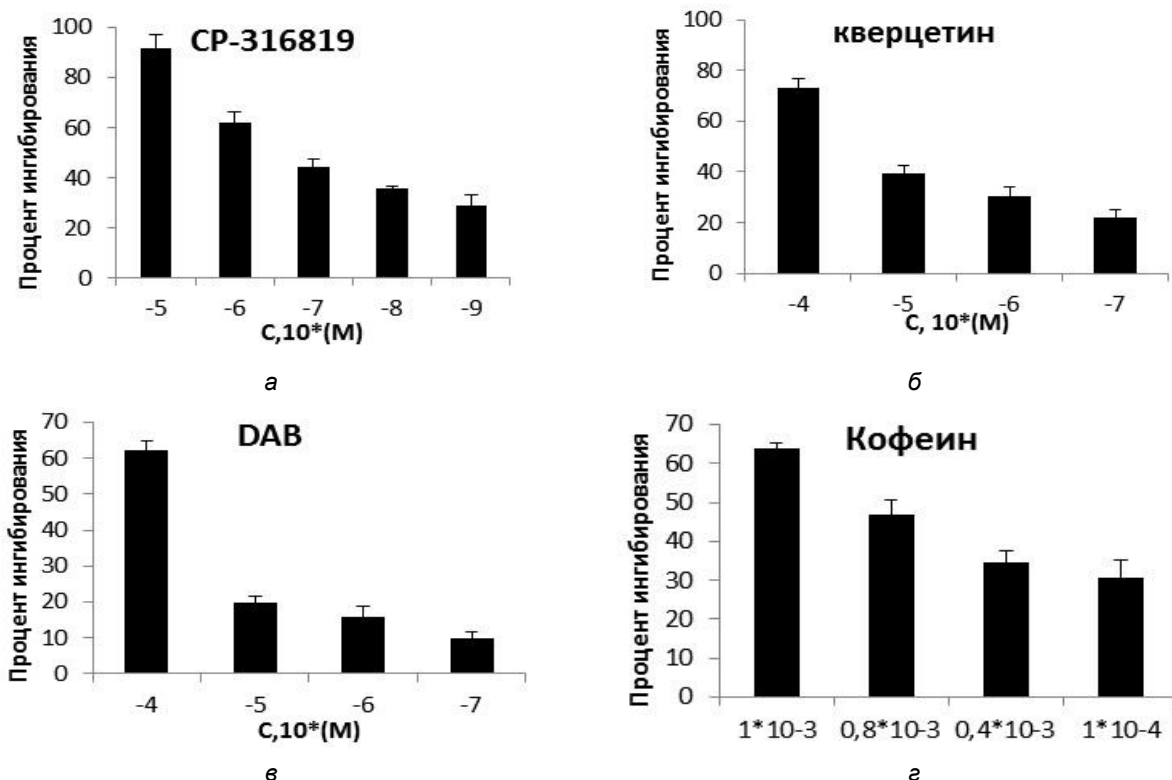


Рис. 1. ГФ ингибирующая активность:
а – CP-316819, б – кверцетина, в – DAB, г – кофеина

Одними из перспективных соединений являются производные индол-2-карбоксамидов, ингибиторы индолкарбоксамидного сайта связывания ГФ. Представитель данного класса – CP-316819, который, по литературным данным, снижал уровень глюкозы у мышей с СД 2-го типа, при этом не вызывая гипогликемию, в то же время не влияло на уровень глюкозы у интактных животных. В результате нашего исследования CP-316819 имел IC_{50} 1,24 мкМ (0,37–4,16 мкМ, 95 % С.И.) (рис. 1 а), что согласуется с ранее полученными результатами (рис. 1) [3].

Помимо этого в нашей работе проверялась ингибирующая активность соединений пуринового сайта связывания, взаимодействие лигандов в данном сайте обуславливается образованием $\pi - \pi$ между остатком ароматической боковой цепи Фен 285, 280s петель и Тир613 [9]. Кофеин является физиологическим лигандом данного сайта, однако демонстрирует низкую афинность к сайту связывания и поэтому активен в миллимолярных концентрациях, так IC_{50} составила 720 мкМ (560–920 мкМ, 95 % С.И.) (рис. 1 в). Также, по литературным данным, известно, что у ряда флавоноидов выявлена

ГФ ингибирующая активность [17], в том числе и у кверцетина IC_{50} = 15,69 мкМ (8,12–30,30 мкМ, 95 % С.И.) (рис. 1 б). Ингибиторы каталитического сайта представлены рядом соединений на основе глюкозы, это связано с контролем метаболизма гликогена глюкозой. Найден ряд ингибиторов среди класса иминосахара, представителем которых является DAB [4].

Данное соединение тормозит гликогенолиз путем прямого ингибирования ГФ. В нашем исследовании DAB продемонстрировало активность и имело IC_{50} = 49,41 мкМ (31,27–78,07 мкМ, 95 % С.И.) (рис. 1 в).

В литературе представлены данные синергетического взаимодействия кофеина и соединения W1807, в результате которых было доказано совместное действие двух лигандов [16], поэтому представляет интерес исследовать комбинированные эффекты ингибиторов различных сайтов. В связи с этим следующим этапом данного исследования была проверка на совместное блокирование ГФ физиологическим лигандом пурина связывающего сайта, кофеином и одним из наиболее активных ингибиторов индолкарбоксамидного сайта CP-316819 (рис. 2).

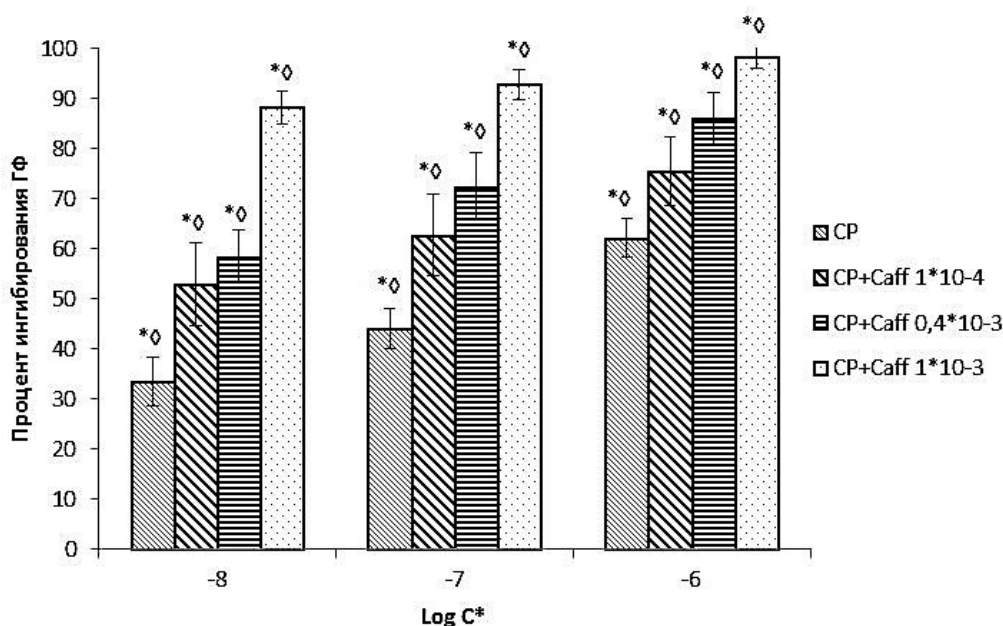


Рис. 2. Синергетический эффект соединений CP-316819 и кофеина:

C* – концентрация (M);

* данные достоверны по отношению к контролю, U-критерий Манна–Уитни ($p < 0,05$);

◇ данные достоверны по отношению к показателям препарата сравнения, U-критерий Манна–Уитни ($p < 0,05$)

В результате изучения совместного влияния двух лигандов на различные сайты фермента выявлен синергетический эффект. При добавлении физиологического лиганда кофеина к ингибитору CP-316819 наблюдалось повышение ингибирующей активности, как видно из рис. 2, которое фиксировалось в диапазоне концентраций от 10^{-8} до 10^{-6} . Так, при сочетании концентраций CP-316819 ($1 \cdot 10^{-6}$ M) и кофеина ($1 \cdot 10^{-3}$ M) достигался максимальный эффект ($98,15 \pm 3,23$ %).

Помимо этого, суммация активностей ингибиторов сохранялась и в более низких концентрациях. Данный вид исследований ингибиторов ГФ актуален, так как в дальнейшем это позволит комбинировать различные соединения, для достижения максимального эффекта, и воздействие на различные сайты ГФ одновременно повысит эффективность данного класса антидиабетических препаратов и снизит дозировки веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате данной работы было проведено изучение активности ингибиторов ГФ СР-316819, DAB, кофеин и кверцетин. Во второй части исследования показана суммация действия двух ингибиторов различных сайтов связывания в дальнейшем, что позволит уменьшать концентрации веществ для создания новых антидиабетических средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аметов А. С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения. – ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 1032 с.
2. Балаболкин М. И. Диабетология. – М.: Медицина, 2000.
3. Чепляева Н. И., Кузнецова В. А., Спасов А. А. и др. // ВМЖ. – 2014. – Т. 43, № 3. – С. 21–24.
4. Andersen B., Westergaard N. // Biochemical Society. – 2002. – Vol. 367. – P. 443–450.
5. Hayes J. M., Kantsadi A. L., Leonidas D. D. // Phytochem Rev. – 2014. – Vol. 13. – P. 471–498.
6. Henderson L. C. // BSc (Hons). – 2007. – P. 269.
7. Jakobs S., Fridrich D., Hofem S., et al. // Mol. Nat. Food Res. – 2006. – Vol. 50 – P. 50–57.
8. Krimm I., Lancelin J-M., Praly J-P. // J. Med. Chem. – 2012. – Vol. 55. – P. 1287–1295.
9. Madsen N. B., Shechosky S., Fletterick R. J. // Biochemistry. – 1983. – Vol. 22. – P. 4460–4465.
10. Newgard C. B., Hwang P. K., Fletterick R. J. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 1989. – Vol. 24. – P. 69–99.
11. Oikonomakos N. G. // Curr. Prot. Pept. Sci. – 2002. – Vol. 3. – P. 561–586.
12. Poucher S. M., Freeman S., Loxham S. J., et al. // Br. J. Pharmacol. – 2007. – Vol. 152. – P. 1239–1247.
13. Schweikes S. S., Loughlin W. A., Brown C. L., et al. // Journal of Peptide Science. – 2009. – Vol. 15. – P. 442–450.
14. Somsak L., Kovacs L., Toth M., et al. // J. Med. Chem. – 2001. – Vol. 44. – P. 2843–2848.
15. Sprang S. R., Withers S. G., Goldsmith E. J., et al. // Science. – 1991. – Vol. 254. – P. 1367–1371.
16. Tsitsanou K. E., Skamnaki V. T., Oikonomakos N. G. // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2000. – Vol. 384. – №. 2. – P. 245–254.
17. Yu L. J., Chen Y., Treadway J. L. // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2006. – Vol. 317, № 3. – P. 1230–1237.