

На правах рукописи

Калужский Леонид Александрович

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ С ЦИТОХРОМОМ P450(51) ЧЕЛОВЕКА

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук.

Москва 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Иванов Алексей Сергеевич

Официальные оппоненты: **Калинин Владимир Иванович**
доктор биологических наук,
ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, лаборатория химии морских природных соединений, ведущий научный сотрудник

Митькевич Владимир Александрович
кандидат химических наук,
ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, лаборатория конформационного полиморфизма белков в норме и патологии, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «11» декабря 2014 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИБМХ.

Автореферат разослан « » _____ 2014 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

Общая характеристика работы.

Актуальность исследования.

Цитохром P450(51) (CYP51) является стерол-14- α -деметилазой и относится к 51 семейству цитохромов P450 [de Montellano, 2005]. Он является одним из ключевых ферментов биосинтеза холестерина у эукариот [Nes, 1977], катализируя реакцию окислительного удаления 14-альфа-метильной группы в молекуле ланостерола [Pikuleva, 2006]. Эта реакция – одна из завершающих стадий эндогенного биосинтеза холестерина, что делает данный фермент перспективной молекулярной мишенью для создания новых лекарств против атеросклероза.

Атеросклероз – тяжёлое хроническое заболевание артерий эластического и мышечно-эластического типа, в основе которого лежит нарушение липидного обмена, сопровождающееся отложением холестерина и некоторых фракций липопротеидов во внутренней оболочке (интима) сосудов. По данным Росстата за 2012 год коэффициент смертности в Российской Федерации составил 13,3 (т.е. 13,3 человека на 1000 населения), при этом смертность, обусловленная болезнями системы кровообращения, в течение последних 10 лет составляет примерно 56% от общей смертности населения. Из этого числа более половины приходится на долю ишемической болезни сердца [Ступаков, 2008], наиболее частой причиной которой является атеросклеротические отложения в интима коронарных сосудов. Одним из перспективных направлений развития медицинской науки в рамках поиска кандидатов для создания препаратов для лечения или профилактики атеросклероза является поиск новых ингибиторов различных ферментных систем биохимического пути синтеза холестерина. В настоящее время наиболее эффективными антихолестеринемическими препаратами считаются ингибиторы 3-ОН-3-метилглутарил-КоА редуктазы (ГМГ-КоА редуктазы) (статины) [Taylor, 2011].

Сильным недостатком статинов является их высокая цена, а также то, что блокировка ГМГ-КоА редуктазы останавливает не только синтез эндогенного холестерина, но и всех остальных продуктов этого метаболического пути, поскольку реакция превращения гидроксиметилглутарил-коэнзима-А в мевалонат является ключевой реакцией в биосинтезе стеролов (стероидных спиртов). Представляется целесообразным обнаружить вещества, способные ингибировать синтез холестерина на более поздних стадиях [Worner, 2012]. Данная работа была направлена на поиск новых ингибиторов цитохрома P450(51) (CYP51A1) человека среди низкомолекулярных соединений и базировалась на проведённых ранее исследованиях [Ivanov, 2010].

Цель работы.

Экспериментальное исследование молекулярных механизмов взаимодействия

низкомолекулярных соединений из класса азолов, стероидов и тритерпенов с цитохромом P450(51) человека.

Задачи.

1) Создание биосенсорной тест-системы для исследования взаимодействий низкомолекулярных соединений с цитохромами семейства P450(51) и её апробация на примере цитохрома P450(51) человека и цитохрома P450(51) азол-резистентного штамма *Candida albicans*.

2) Определение кинетических и равновесных параметров межмолекулярных взаимодействий низкомолекулярных соединений из классов азолов, стероидов и тритерпенов с цитохромом P450(51) человека.

3) Исследование взаимодействия тестовой выборки низкомолекулярных соединений с цитохромом P450(51) человека с помощью технологии спектрального титрования как альтернативного метода и биохимическая проверка отобранных по взаимодействию с цитохромом P450(51) человека низкомолекулярных соединений на их способность ингибировать активность данного фермента.

4) Анализ термодинамики взаимодействия найденных ингибиторов с цитохромом P450(51) человека и выяснение роли энтропийного и энтальпийного факторов.

Научная новизна работы.

Результаты работы носят в первую очередь фундаментальный характер. Описано взаимодействие ряда низкомолекулярных соединений стероидной природы, полученных от растительных и животных организмов, с цитохромом P450(51) человека, взаимодействие с которыми ранее не изучалось. Определены термодинамические параметры взаимодействия 9 тестовых соединений с цитохромом P450(51) человека. Показано, что данные соединения можно разделить на три группы, где ведущую роль во взаимодействии с цитохромом играет: (1) энтропия, (2) энтальпия, (3) одновременно энтальпия и энтропия.

Обнаружено 5 новых ингибиторов цитохрома P450(51) человека стероидной природы и три соединения, показавшие способность взаимодействовать с активным центром P450(51) *Candida albicans*.

На примере цитохрома P450(51) *Candida albicans* показано, что предложенный алгоритм поиска новых ингибиторов P450(51) и характеристики их взаимодействий с целевым белком можно применить к другим белкам семейства P450.

Научно-практическая ценность работы.

Полученные фундаментальные данные могут быть использованы в научных исследованиях биохимии монооксигеназных систем.

Созданная биосенсорная тест-система может быть применена для поиска потенциальных ингибиторов различных представителей семейства цитохромов P450(51), являющихся возможными кандидатами для создания новых антиатеросклеротических и антимикотических препаратов.

Найденные новые ингибиторы цитохрома P450(51) человека можно рассматривать как базовые структуры для создания антиатеросклеротических препаратов, снижающих уровень холестерина.

Полученные термодинамические данные о взаимодействии низкомолекулярных соединений с цитохромом P450(51) человека могут быть использованы в компьютерном конструировании новых лекарственных препаратов, взаимодействующих с цитохромами семейства P450(51) как мишенями.

Положения, выносимые на защиту.

- 1) Биосенсорная тест-система для исследования взаимодействий низкомолекулярных соединений с цитохромами семейства P450(51) с помощью поверхностного плазмонного резонанса.
- 2) Определение кинетических и равновесных параметров взаимодействий отдельных низкомолекулярных соединений с цитохромом P450(51) человека методом поверхностного плазмонного резонанса и спектрального титрования.
- 3) Голотурин А, бетулафолиентриол, теасапонин, хенрициозид Н₁, левискулозид G – новые ингибиторы цитохрома P450(51) человека.
- 4) Определение термодинамических параметров взаимодействия ланостерола, голотурин А, бетулафолиентриола, теасапонина, хенрициозида Н₁, левискулозида G, кетокконазола, а также дигитонина и астеросапонина Р₁ с цитохромом P450(51) человека. Разделение данных соединений на три группы, где ведущую роль во взаимодействии с цитохромом играет: (1) энтропия, (2) энтальпия, (3) одновременно энтальпия и энтропия.

Апробация работы.

Результаты диссертационной работы были доложены на следующих конференциях:

- 1) Международная виртуальная интернет-конференция «Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы». 12-15 марта 2012, на базе ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)

федеральный университет», Казань, Россия;

- 2) IV Съезд биофизиков России, 20 - 26 августа 2012, Нижний Новгород, Россия;
- 3) II Всероссийская научная конференция молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», 12-14 ноября, Санкт-Петербург, Россия;
- 4) VI Всероссийский конгресс по медицинской микологии. Москва, 8-10 апреля 2014, Москва, Россия;
- 5) V Международная конференция «Химия, структура и функция биомолекул», Минск, 4-6 июня 2014 г.

Личный вклад автора.

Планирование всех экспериментов, анализ и интерпретация экспериментальных данных, формулировка теоритических положений выполнены автором работы под руководством д.б.н., профессора Иванова А.С. Все экспериментальные работы на оптическом биосенсоре выполнены автором лично. Спектральное титрование и биохимическое тестирование на способность соединений ингибировать активность ферментов были проведены совместно со Шкель Т.В., Грибовец И.П., к.х.н. Янцевичем А.В., к.х.н. Струшкевич Н.В. под руководством к.б.н. Гилепа А.А. в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Республика Беларусь, Минск.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 9 работ, из них 2 статьи в ведущих рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК Минобрнауки России, 2 статьи в зарубежном журнале «Proteomics», 5 публикаций в сборниках трудов научных конференций.

Структура и объём работы.

Диссертационная работа изложена на 140 страницах машинописного текста, содержит 5 таблиц и 56 рисунков и состоит из следующих основных разделов: введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, список литературы.

Список литературы включает 232 источника.

Материалы и методы.

Белки.

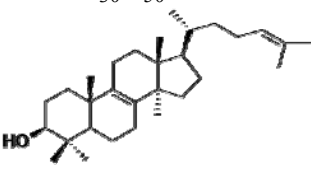
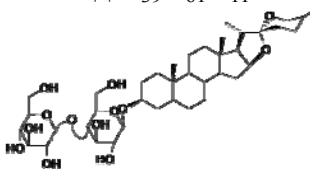
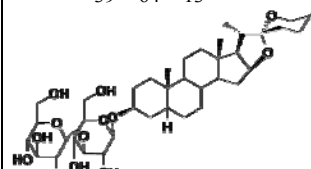
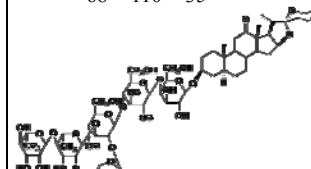
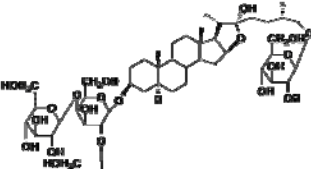
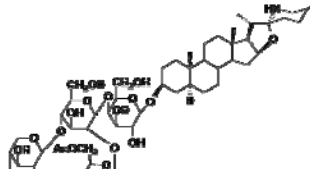
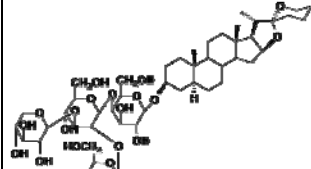
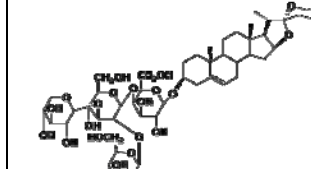
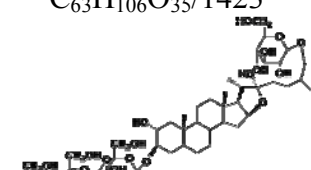
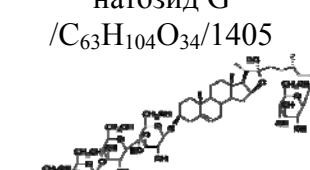
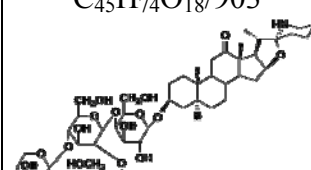
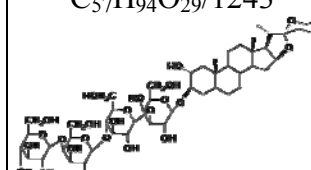
Для работы были использованы высокоочищенные (не менее 95% чистоты по ДСН-электрофорезу в 12% ПААГ) рекомбинантные СУР51 человека (дикий тип) и *Candida albicans* (резистентный к азолам штамм, содержащий мутации К-179-Е, L-224-І, G-307-С, M-372-Т),

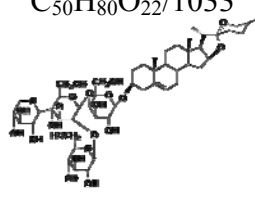
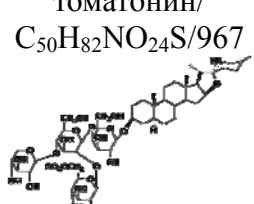
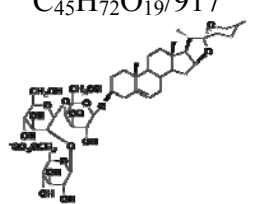
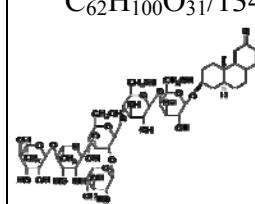
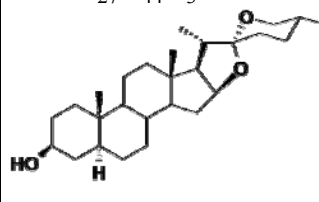
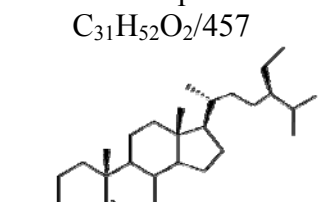
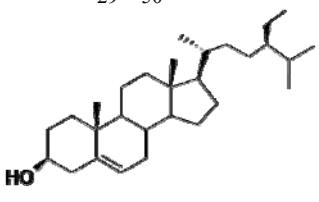
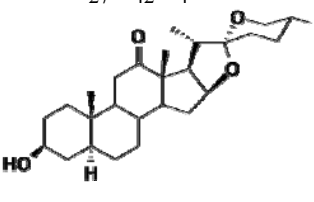
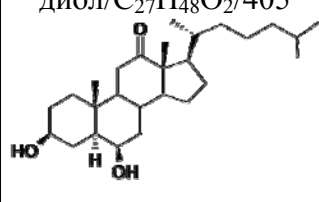
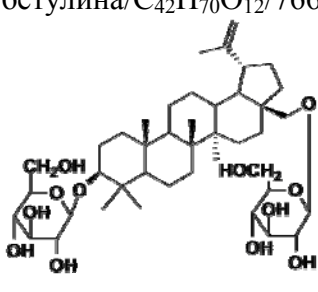
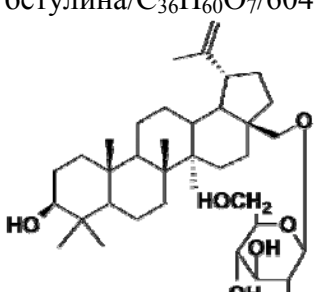
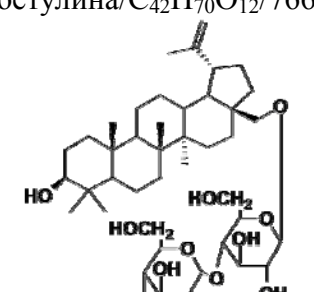
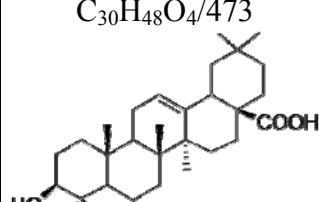
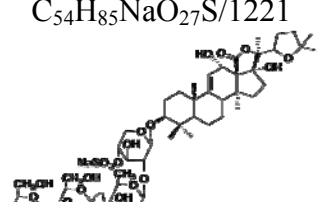
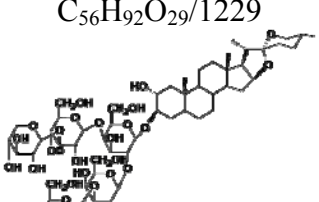
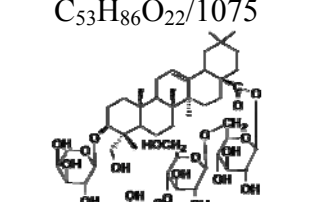
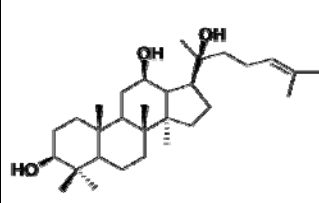
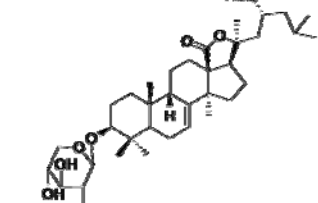
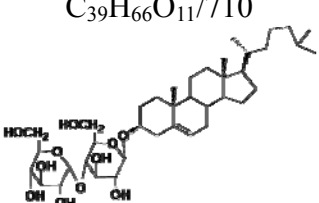
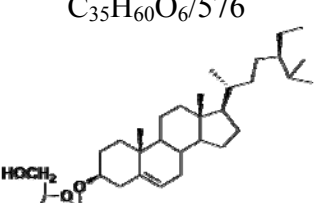
любезно предоставленные к.х.н. Гилепом А.А. (Институт биоорганической химии НАН Беларуси).

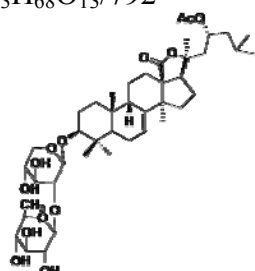
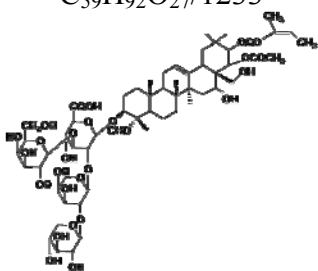
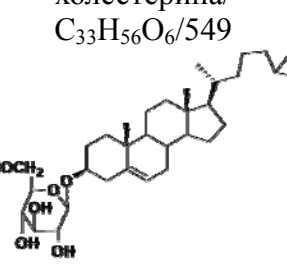
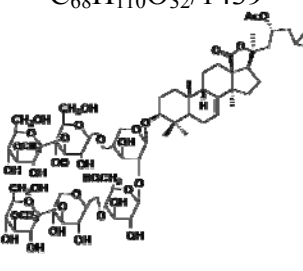
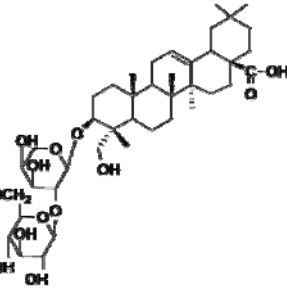
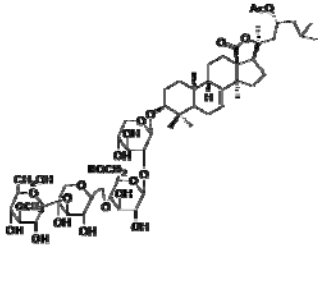
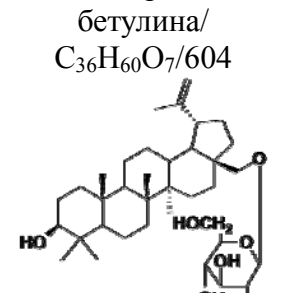
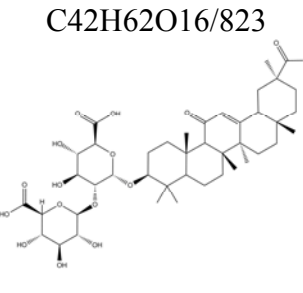
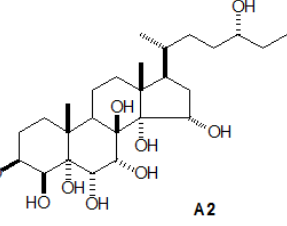
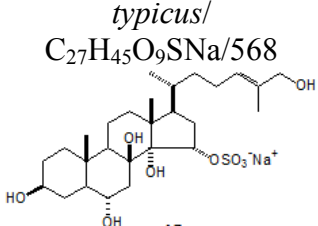
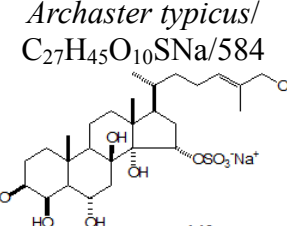
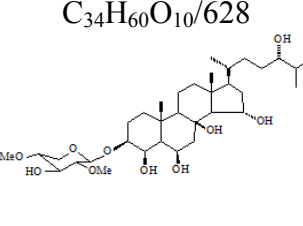
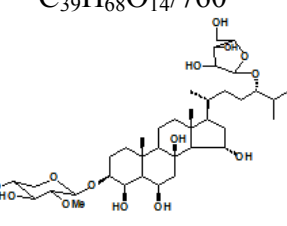
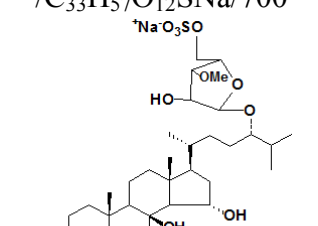
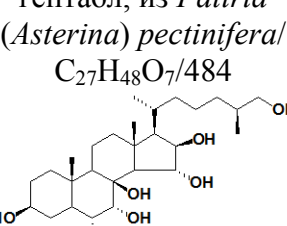
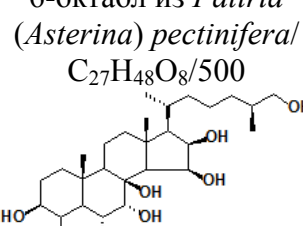
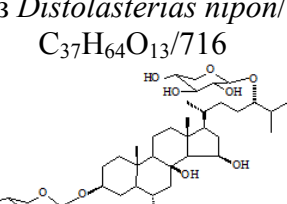
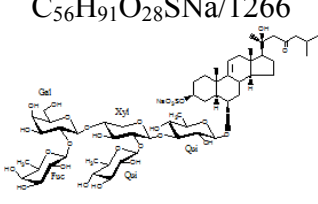
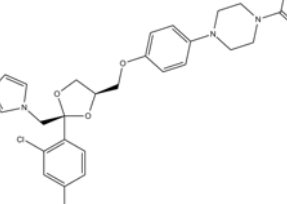
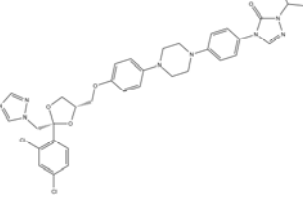
Низкомолекулярные соединения.

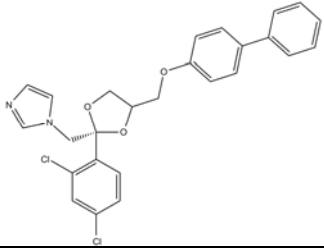
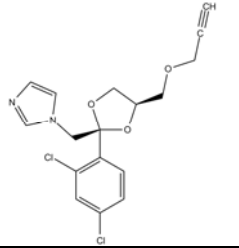
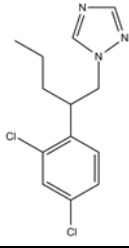
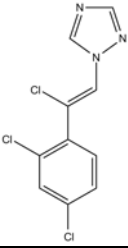
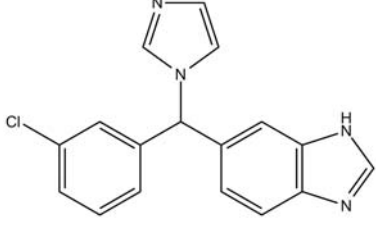
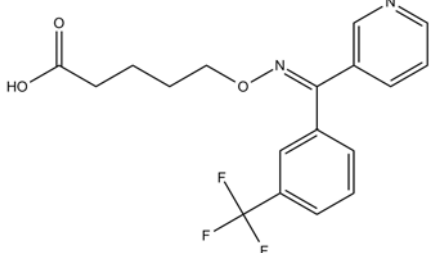
В работе были использованы различные низкомолекулярные соединения из класса азолов, стероидов и тритерпенов растительного и животного происхождения (таб. 1). Ланостерол (№1) и азолы (№№ 51-58) были получены от фирмы Sigma (США). Соединения №№ 2-20 были любезно предоставлены профессором Kintya P. (The Institute of Genetics and Plant Physiology of the Academy of Sciences of Moldova). Соединения 21-40 были взяты из лабораторной коллекции низкомолекулярных соединений. Низкомолекулярные соединения №№ 41-50, выделенные из морских звёзд: *Patiria pectinifera* (PP1, PP3, PP4), *Henricia* sp. (HD-1), *Henricia derjugini* (HD-2), *Distolasterias nipon* (D1), *Archaster typicus* (AT-2, AT-7, AT-10, TA) – были любезно предоставлены академиком Стоником В.А. и д.б.н. Кича А.А. (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук).

Таб. 1. Соединения, использованные в работе.

№ соединения название/брутто-формула/мол. вес, Da/			
<p>№1 Ланостерол /C₃₀H₅₀O/427</p> 	<p>№2 Неотигогенина биозид/C₃₉H₆₁O₁₁/705</p> 	<p>№3 Аспарогозид С/ C₃₉H₆₄O₁₃/741</p> 	<p>№4 Агавозид F/ C₆₈H₁₁₀O₃₅/1488</p> 
<p>№5 Томатозид А/ C₅₁H₈₆O₂₄/1083</p> 	<p>№6 Ацетат томатонина/ C₄₇H₇₆O₁₉/944</p> 	<p>№7 F-гитонин/ C₅₀H₈₂O₂₃/1051</p> 	<p>№8 Функциозид Н/ C₆₂H₁₀₀O₃₀/325</p> 
<p>№9 Капсикозид А/ C₆₃H₁₀₆O₃₅/1423</p> 	<p>№10 Протополиго- натозид G /C₆₃H₁₀₄O₃₄/1405</p> 	<p>№11 Томатонин/ C₄₅H₇₄O₁₈/903</p> 	<p>№12 Капсикозин/ C₅₇H₉₄O₂₉/1243</p> 

№ соединения название/брутто-формула/мол. вес, Да/			
<p>№13 Функиозид F/ C₅₀H₈₀O₂₂/1033</p> 	<p>№14 Сульфированный томатонин/ C₅₀H₈₂NO₂₄S/967</p> 	<p>№15 Агавасапонин С/ C₄₅H₇₂O₁₉/917</p> 	<p>№16 Агавасапонин Е/ C₆₂H₁₀₀O₃₁/1341</p> 
<p>№17 Тигогенин/ C₂₇H₄₄O₃/417</p> 	<p>№18 Ацетат β- ситостерола/ C₃₁H₅₂O₂/457</p> 	<p>№19 β-ситостерол/ C₂₉H₅₀O/415</p> 	<p>№20 Гекогенин/ C₂₇H₄₂O₄/431</p> 
<p>№21 5α-холестан-3β,6β- диол/C₂₇H₄₈O₂/405</p> 	<p>№22 Бисглюкозид бетулина/C₄₂H₇₀O₁₂/766</p> 	<p>№23 Глюкозид бетулина/C₃₆H₆₀O₇/604</p> 	<p>№24 Мальтозид бетулина/C₄₂H₇₀O₁₂/766</p> 
<p>№25 Хедерагенин/ C₃₀H₄₈O₄/473</p> 	<p>№26 Голотурин А/ C₅₄H₈₅NaO₂₇S/1221</p> 	<p>№27 Дигитонин/ C₅₆H₉₂O₂₉/1229</p> 	<p>№28 Каулозид D/ C₅₃H₈₆O₂₂/1075</p> 
<p>№29 Бетулафоли- ентриол/ C₃₀H₅₂O₃/461</p> 	<p>№30 Стихопозид В/ C₄₃H₆₈O₁₄/809</p> 	<p>№31 Мальтозид холестерина/ C₃₉H₆₆O₁₁/710</p> 	<p>№32 Глюкозид β- ситостерола/ C₃₅H₆₀O₆/576</p> 

№ соединения название/брутто-формула/мол. вес, Да/			
<p>№33 Стихопозид А/ C₄₃H₆₈O₁₃/792</p> 	<p>№34 Теасапонин/ C₅₉H₉₂O₂₇/1233</p> 	<p>№35 Глюкозид холестерина/ C₃₃H₅₆O₆/549</p> 	<p>№36 Стихопозид С/ C₆₈H₁₁₀O₃₂/1439</p> 
<p>№37 Каулозид С/ C₄₁H₆₆O₁₃/767</p> 	<p>№38 Теленотозид В/ C₅₅H₈₈O₂₃/1117</p> 	<p>№39 28-О-β-D- глюкопиранозид бетулина/ C₃₆H₆₀O₇/604</p> 	<p>№40 Глицирризиновая кислота/ C₄₂H₆₂O₁₆/823</p> 
<p>№41 АТ-2. Нонаол А2 из <i>Archaster typicus</i>/C₂₆H₄₆O₉/502</p>  <p style="text-align: center;">A2</p>	<p>№42 АТ-7. Сульфатированный гексаол А7 из <i>Archaster typicus</i>/ C₂₇H₄₅O₉SNa/568</p>  <p style="text-align: center;">A7</p>	<p>№43 АТ-10. Сульфатированный гептаол А10 из <i>Archaster typicus</i>/ C₂₇H₄₅O₁₀SNa/584</p>  <p style="text-align: center;">A10</p>	<p>№44 HD-1. Хенрициозид Н₁ из <i>Henricia derjugini</i>/ C₃₄H₆₀O₁₀/628</p> 
<p>№45 HD-2. Левискулозид G из <i>Henricia derjugini</i>/ C₃₉H₆₈O₁₄/760</p> 	<p>№46 PP1. Астеросапонин P₁ из <i>Patiria pectinifera</i> /C₃₃H₅₇O₁₂SNa/700</p> 	<p>№47 PP3. (25S)-5a- холестан- 3b,6a,7a,8,15a,16b,26- гептаол, из <i>Patiria (Asterina) pectinifera</i>/ C₂₇H₄₈O₇/484</p> 	<p>№48 PP4. (25S)-5a- холестан- 3b,4b,6a,7a,8,15b,16b,2 6-октаол из <i>Patiria (Asterina) pectinifera</i>/ C₂₇H₄₈O₈/500</p> 
<p>№49 D1. Дистоластериозид D1 из <i>Distolasterias nipon</i>/ C₃₇H₆₄O₁₃/716</p> 	<p>№50 ТА. Торнастерозид А из <i>Archaster typicus</i>/ C₅₆H₉₁O₂₈SNa/1266</p> 	<p>№51 Кетоконазол/ C₂₆H₂₈Cl₂N₄O₄/531</p> 	<p>№52 Итраконазол/ C₃₅H₃₈Cl₂N₈O₄/706</p> 

№ соединения название/брутто-формула/мол. вес, Да/			
№53 Доконазол/ $C_{26}H_{22}Cl_2N_2O_3/481$ 	№54 Парконазол/ $C_{17}H_{16}Cl_2N_2O_3/367$ 	№55 Пенконазол/ $C_{13}H_{15}Cl_2N_3/284$ 	№56 Лореклезол/ $C_{10}H_6Cl_3N_3/275$ 
№57 Лиарозол/ $C_{17}H_{13}ClN_4/309/$ 		№58 Ридогрел/ $C_{18}H_{17}F_3N_2O_3/366/$ 	

Поверхностный плазмонный резонанс.

Для исследования межмолекулярных взаимодействий был использован 4-х канальный оптический биосенсор Biacore 3000 (GE Healthcare, США). Изменение сигнала биосенсора регистрировалось в каждом канале в реальном времени в виде сенсограмм в резонансных единицах (RU), где 1 RU соответствует связыванию 1 пг белка на поверхности оптического чипа). Все эксперименты были выполнены с использованием стандартных оптических чипов CM5, покрытых слоем карбоксиметилированного декстрана.

Подготовка оптического биосенсора к работе.

Микрожидкостная система оптического биосенсора Biacore 3000 перед проведением экспериментов очищалась растворами biadesorb solution-1 (0,5 % додецилсульфат натрия) и biadesorb solution-2 (50 мМ глициновый буфер, pH 9,0) при температуре 25°C. Процедура проводилась после установки в прибор специального чипа maintenance с параметрами инъекций растворов, рекомендованных производителем.

Подбор иммобилизационного буфера.

Для определения оптимальных условий иммобилизации белка на карбоксиметилированном декстране чипа CM5, выполнялось исследование уровня электростатического концентрирования белка у поверхности оптического чипа в зависимости от pH иммобилизационного буфера. В качестве рабочего буфера использовали HBS-N (150 мМ NaCl, 10 мМ HEPES, pH 7,4). Были приготовлены растворы белка CYP51A1 концентрацией 20 мкг/мл (0,38 мкМ) в стандартных иммобилизационных ацетатных буферах, предлагаемых производителем, (10 мМ ацетат натрия) pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5. Инъекции проводились согласно

стандартной методике производителя в течение 2-х минут при скорости потока 10 мкл/мин.

После каждой инъекции поверхность чипа промывали регенерационным раствором (1 М NaCl, 0,2% CHAPS в HBS-N).

Приготовление экспериментальных образцов низкомолекулярных соединений для анализа межмолекулярных взаимодействий в оптическом биосенсоре.

Низкомолекулярные соединения (№ 2-50, 52-58) растворялись в диметилсульфоксиде (ДМСО), а затем разводились до концентрации 100 мкМ HBS-N буфером, не содержащим ДМСО. Конечные концентрации образцов для анализа готовились с использованием рабочего HBS-N буфера с добавлением ДМСО. Концентрация ДМСО в рабочем буфере была нормализована по коэффициенту преломления среды с 100 мкМ образцами соединений с использованием рефрактометра RX-5000 (ATAGO, Япония).

Образцы ланостерола и кетоконазола были приготовлены аналогичным образом, но вместо ДМСО использовался 99% этанол. Все экспериментальные аликвоты ланостерола готовились непосредственно перед инъекцией в биосенсор.

Иммобилизация CYP51 человека и Candida albicans на поверхности оптического чипа CM5.

В качестве рабочего буфера использовали HBS-N буфер. Карбоксильные группы декстрана были активированы путём пропускания смеси равных объёмов 0,2 М EDC и 0,05 М NHS в течение 7 минут при скорости потока 5 мкл/мин с последующей промывкой буфером HBS-N при той же скорости в течение 1 мин. Далее осуществляли иммобилизацию CYP51 путём пропускания его раствора (20 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (pH 5,0) по каналам биосенсора в течение 10 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Не прореагировавшие с белком активированные карбоксильные группы декстрана блокировали пропусканием 1 М раствора этаноламин-HCl (pH 8,5) в течение 1 мин при скорости потока 5 мкл/мин.

Анализ способности низкомолекулярных соединений взаимодействовать с CYP51 человека.

В качестве рабочего буфера использовали HBS-N буфер, содержащий ДМСО, концентрация которого была нормализована по коэффициенту преломления среды с 100 мкМ образцами соединений. Скрининг осуществляли путём последовательного пропускания 30 мкМ растворов низкомолекулярных соединений через опытный (с иммобилизованным CYP51) и контрольный (без белка) каналы биосенсора в течение 6 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Поверхность оптического чипа регенерировали двукратной инъекцией регенерационного раствора (2 М NaCl, 0,4% m/v CHAPS в HBS-N) в течение 17 с при скорости потока 35 мкл/мин.

Результаты скрининга оценивали по разности сигналов опытного и контрольного каналов биосенсора на последней минуте инъекции раствора низкомолекулярного соединения. Эксперимент повторяли не менее трёх раз.

При работе с кетоконазолом и ланостеролом эксперимент проводился по аналогичной методике, но вместо ДМСО в рабочий буфер добавляли этанол.

Регистрация кинетических и термодинамических параметров взаимодействий низкомолекулярных соединений с СУР51.

В качестве рабочего буфера использовали HBS-N буфер от производителя с добавлением этанола (при работе с ланостеролом, кетоконазолом) или ДМСО (при работе со всеми остальными соединениями). Концентрации ДМСО и этанола в рабочем буфере были нормализованы по коэффициенту преломления среды с 100 мкМ образцами соединений с использованием рефрактометра RX-5000 (ATAGO, Япония). Растворы низкомолекулярных соединений пропускались через контрольный и опытный каналы биосенсора в течении 360 секунд при скорости потока 10 мкл/мин в диапазоне концентраций при работе с СУР51 человека: 5-50 мкМ (соединения №№ 43, 44, 45) и 1-10 мкМ (соединение №9), 10-100 мкМ (остальные соединения); а при работе с СУР51 *Candida albicans*: 10-100 мкМ (соединения №№ 41-50) – после окончания инъекции диссоциация комплексов «СУР51-низкомолекулярное соединение» регистрировалась в течении не менее чем 360 секунд. Поверхность оптического чипа регенерировали двукратной инъекцией регенерационного раствора (2 М NaCl, 0,4% m/v CHAPS в HBS-N) в течение 17 с при скорости потока 35 мкл/мин. Для расчёта термодинамических параметров взаимодействия низкомолекулярных соединений с СУР51 человека получали серии сенсограмм взаимодействий в диапазоне температур 10-40°C. Эксперименты повторяли не менее трёх раз.

Обработка данных, полученный с помощью оптического биосенсора.

Графики и диаграммы строились и обрабатывались в программах OpenOffice Calc PRO 3.3.0 (Oracle Corporation, США) и Grapher 8.5.733 (Golden Software, США), расчёт экспериментальных данных выполнялся в программе VIAevaluation 4.1 (GE Healthcare, США).

Расчёт термодинамических параметров взаимодействия низкомолекулярных соединений с СУР51A1.

Были рассчитаны значения равновесной константы диссоциации комплекса «СУР51A1-низкомолекулярное соединение» в диапазоне температур 10-40°C, которые были использованы для построения графиков зависимости $\ln K_D$ от $1000/T$. Поскольку графики уравнений Вант-Гоффа для всех образцов показывали линейную зависимость, был построен график линейной регрессии, и получены значения изменения энтропии $\Delta H/R$ (где R – универсальная газовая постоянная) как значение тангенса угла наклона прямой экстраполяции. Значения изменения энтропии были получены из неинтегральной формы уравнения Вант-Гоффа:

$$\ln K_D = \Delta H/RT - \Delta S/R$$

Где K_D – константа диссоциации комплекса «CYP51A1 – низкомолекулярное соединение», T – абсолютная температура, ΔH – изменение энтальпии, ΔS – изменение энтропии, R – универсальная газовая постоянная.

Изменение энергии Гиббса получали из уравнения

$$\Delta G^\circ = RT \ln K_D$$

Где ΔG° – изменение энергии Гиббса, K_D – константа диссоциации комплекса «CYP51A1 – низкомолекулярное соединение», T – абсолютная температура.

Спектральное титрование.

Спектрофотометрическое титрование CYP51 проводилось на спектрофотометре Shimadzu UV-3000 (Shimadzu Corporation, Япония). Раствор белка в конечной концентрации 1 мкМ в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4 помещали в две кюветы ($l=1\text{см}$). В опытную кювету добавляли раствор низкомолекулярного соединения в этаноле (диапазон концентраций 0,05 – 33,4 мкМ), в контрольную кювету добавляли равный объем растворителя. Разностный спектр поглощения белка регистрировали в области 350–500 нм через 5 мин после добавления лиганда. Контроль нативной P450 конформации белка в конце титрования осуществляли, записывая спектр поглощения СО-разностного спектра восстановленной формы белка в диапазоне 400-500 нм. При проведении эксперимента объемная концентрация этанола в кювете не превышала 3%.

Расчёт константы диссоциации комплекса белка с низкомолекулярным соединением в экспериментах по спектральному титрованию.

В качестве параметра, характеризующего связывание низкомолекулярных соединений в активном центре, использовали константу диссоциации комплекса фермент-лиганд (K_D). K_D определяли, аппроксимируя данные спектрофотометрического титрования нелинейной функцией по алгоритму Левенберга-Марквардта, реализованному в программе Origin v. 8.1 (OriginLab Corporation, США):

$$A = A_{max} \frac{[L] + [E]_0 + K_D - \sqrt{([L] + [E]_0 + K_D)^2 - 4[E]_0[L]}}{2[E]_0}$$

где A – амплитуда спектрального изменения при концентрации лиганда $[L]$; A_{max} – амплитуда спектрального изменения при насыщении фермента лигандом; $[L]$ – концентрация лиганда в текущий момент времени; $[E]_0$ – концентрация фермента, в нашем случае CYP51A1, составляет 1 мкМ.

Биохимическое тестирование на способность низкомолекулярных соединений ингибировать CYP51 человека.

Активность CYP51 измерялась в реконструированной системе при 37 °С в 25 мМ HEPES-буфере (pH 7.5), содержащем 10 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, 10 мг/мл дилаурофосфатидилхолин и 0,1% метил-β-циклодекстрин. Аликвоты концентрированных рекомбинантных белков (CYP51 человека, CPR, изоцитрат дегидрогеназа) смешивались и инкубировались 5 минут при комнатной температуре. Низкомолекулярные соединения (10 мМ раствор в этаноле) добавлялись к реакционной смеси до финальной концентрации концентрации 1, 10, 50 мкМ. Итоговая реакционная смесь содержала 100 мкМ ланостерола, 0,5 мкМ CYP51 человека, 1,0 μМ CPR, 1 мМ НАДФ·Н, 8 мМ изоцитрата и 0,1 U изоцитрат дегидрогеназы. Аликвоты по 0,5 мл забирались из инкубационной смеси на 0 и 30-й минуте эксперимента. Стероидная фракция экстрагировалась с 3 мл дихлорметана и анализировалась на жидкостном хроматографе HP1090 (Agilent, США) на колонке Bondapak C18-column (3,9×300 мм (Waters, США), в системе ацетонитрил/вода. В качестве внутреннего стандарта использовали прогестерон, площадь пиков определяли компьютерным способом. Продукты ферментативной реакции определяли с помощью ВЭЖХ на колонке Hypersil Gold C18 HPLC column (2,1×100 мм) (Thermo Scientific, США). Образцы продуктов были разделены градиентом элюции в системе ацетонитрил/вода. Хроматографическая система была совмещена с масс-спектрометром с ионной ловушкой LCQ Fleet (Thermo Electron, США), с установленным модулем химической ионизации при атмосферном давлении. Продукты ферментативной реакции были определены в положительном ионном режиме при температуре испарителя 350 °С. Стероиды определялись УФ-детектором при длине волны 254 нм и оценивались по характеристике масса/заряд в спектре масса² по опубликованной методике [Trosken, 2004].

Результаты и их обсуждение.

Подбор иммобилизационного буфера.

Был проведён подбор иммобилизационного буфера по стандартной методике производителя. Т.к. в работе исследовали взаимодействия низкомолекулярных соединений с иммобилизованным белком, то получение максимального уровня иммобилизации белка для увеличения уровня сигнала биосенсора было одной из приоритетных задач, поскольку для взаимодействий такого типа характерны низкие уровни сигнала. Было обнаружено, что иммобилизационный буфер с pH 5,0 показал высокий уровень электростатического концентрирования и наибольший уровень остаточного связывания белка, являясь в то же время более щадящим для нативной структуры CYP51A1, чем более кислые буферы. Данный буфер использовали в дальнейшем для иммобилизации.

Иммобилизация CYP51A1.

Количество иммобилизованного на чипе цитохрома составляло в среднем 15000 RU, что соответствует 15 нг белка на 1 мм² иммобилизационной поверхности. Таким образом, удалось

добиться значительного уровня иммобилизации CYP51A1 на поверхности оптического чипа CM5, что в дальнейшем позволило регистрировать сигналы невысокой интенсивности (в пределах 0-30 RU по разнице сигналов между опытным и контрольным каналами биосенсора) для некоторых представителей тестовой выборки низкомолекулярных соединений.

Анализ способности низкомолекулярных соединений взаимодействовать с CYP51 человека.

Перед началом эксперимента для оценки работоспособности тест-системы для анализа связывания низкомолекулярных соединений с иммобилизованным цитохромом P450 предварительно подтверждали эффективность его взаимодействия с ланостеролом в конечной концентрации последнего 30 мкМ.

Было проведено скрининговое исследование выборки низкомолекулярных соединений на способность взаимодействовать с CYP51A1. Большинство использованных для скрининга веществ представляли собой конъюгированные соединения, содержащие стероид-подобный структурный элемент. Также в выборке присутствовал ряд азольных соединений, включая известный ингибитор цитохрома CYP51A1 кетоконазол. В результате проведенных экспериментов по связыванию различных лигандов с иммобилизованным CYP51A1 на поверхности оптического чипа было показано, что ряд соединений способен взаимодействовать с ферментом (рис. 1). Нужно отметить, что из 8 азольных соединений (№№ 51-58) способность связываться с иммобилизованным CYP51 показал только кетоконазол.

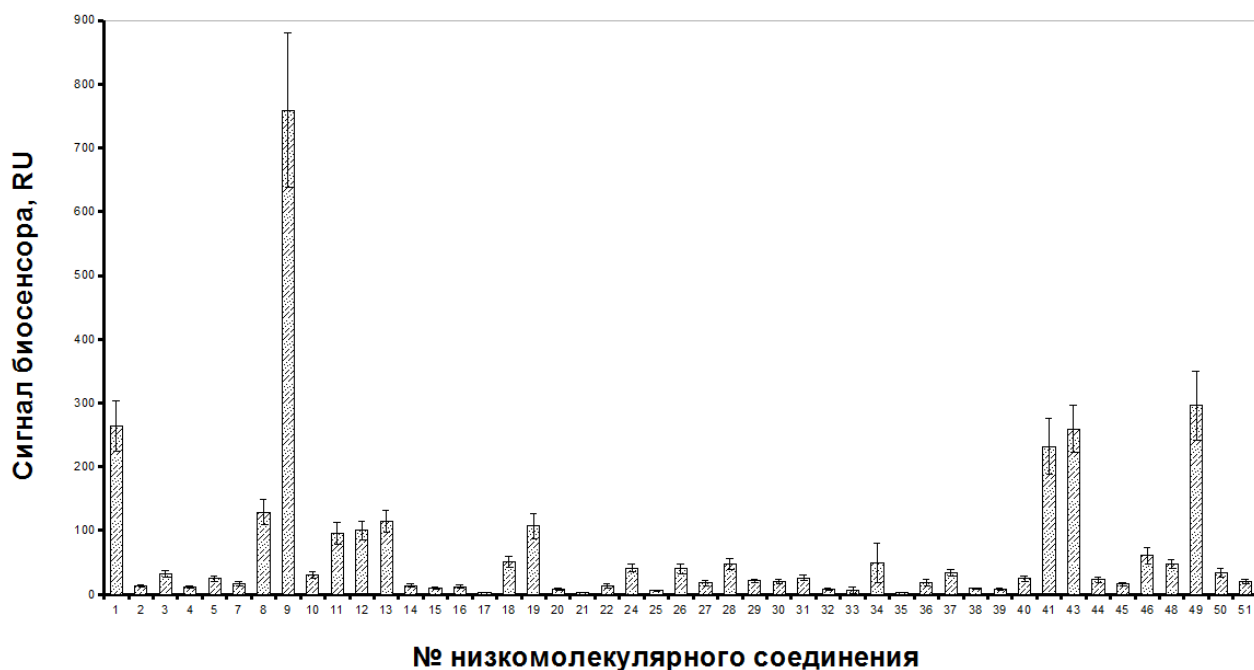


Рис. 1. Анализ способности низкомолекулярных соединений взаимодействовать с CYP51A1. Концентрация низкомолекулярных соединений 30 мкМ. Уровень иммобилизации белка – 15000 RU.

Анализ аффинности взаимодействия низкомолекулярных соединений с CYP51A1.

Для соединений, показавших уровень сигнала, превышающий 15 RU (уровень отсека) был введён эмпирически для выбраковки наименее активно связывающихся с иммобилизованным белком соединений, поскольку низкий уровень связывания свидетельствует о более низкой скорости образования комплексов «CYP51A1-низкомолекулярное соединение») (таб. 1. №№ 3, 5, 7-13, 18, 19, 24, 26-31, 34, 36, 37, 40-41, 43-46, 48-51), в экспериментах на оптическом биосенсоре были получены значения равновесных констант диссоциации (K_D) комплексов «CYP51A1-низкомолекулярное соединение» (таб. 2).

Каждое измерение проводилось в трёх повторах. Для соединений №№ 3, 10, 11 получить значимые для обчёта сенсограммы не удалось. Это можно объяснить плохой растворимостью этих соединений, возможным присутствием в образце неизвестных примесей, или губительным воздействием этих соединений на иммобилизованный белок.

Анализ связывания низкомолекулярных соединений в активном центре CYP51A1 методом спектрального титрования.

С помощью спектрального титрования соединения, показавшие способность взаимодействовать с CYP51 человека, были проанализированы на способность связываться в активном центре этого фермента и влиять на спиновое состояние атома железа гема. Положительные результаты были получены для капсикозина, голотуринина А, бетулафолиентриола, теасапонина, HD-1, HD-2, PP1. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица №2. Константы диссоциации комплексов CYP51A1 с низкомолекулярными соединениями, полученные с помощью оптического биосенсора и спектрального титрования.

№ соединения	Соединение	K_D комплекса с CYP51A1, мкМ	
		Биосенсор	Спектральное титрование
1	Ланостерол	$2,10 \pm 0,32$	$5,75 \pm 0,49^*$
3	Аспаракозид С	ND	ND
5	Томатозид	$14,90 \pm 2,38$	ND
7	F-гитонин	$62,00 \pm 10,54$	ND
8	Функиозид Н	$24,10 \pm 3,37$	ND
9	Капсикозид А	$6,67 \pm 1,27$	ND
10	Протополигонатозид G	ND	ND
11	Томатонин	ND	ND
12	Капсикозин	$18,70 \pm 3,37$	$2,42 \pm 0,72$
13	Функиозид F	$0,27 \pm 0,05$	ND
18	Ацетат β -ситостерина	$118,00 \pm 23,6$	ND

19	β-ситостерин	3,56 ± 0,61	ND
24	Мальтозид бетулина	26,00 ± 3,64	ND
26	Голотурин А	19,50 ± 3,71	78,10 ± 11,70
27	Дигитонин	27,00 ± 4,59	ND
28	Каулозид D	5,30 ± 0,90	ND
29	Бетулафолиентриол	7,00 ± 1,26	3,04 ± 0,52
30	Стихопозид В	9,00 ± 1,35	ND
31	Мальтозид холестерина	7,70 ± 1,46	ND
34	Теасапонин	140,00 ± 25,20	21,96 ± 4,40
36	Стихопозид С	60,00 ± 13,80	ND
37	Каулозид С	18,00 ± 3,06	ND
40	Глицирризиновая кислота	50,0 ± 4,0	ND
41	AT-2	5,54 ± 1,11	ND
43	AT-10	12,50 ± 2,01	ND
44	HD-1	0,34 ± 0,06	0,77 ± 0,21
45	HD-2	0,65 ± 0,11	0,08 ± 0,02
46	PP1	1,52 ± 0,29	0,03 ± 0,01
48	PP4	7,12 ± 1,07	ND
49	D1	1,85 ± 0,28	ND
50	TA	7,11 ± 1,00	ND
51	Кетоконазол	6,1 ± 0,5	0,18 ± 0,02*

ND – зафиксировать значимые параметры взаимодействия не удалось.

* – по данным предыдущих работ [Strushkevich, 2010].

Как видно из таблицы 2, значения K_D , полученные с помощью оптического биосенсора и спектрального титрования различны. Это можно объяснить, во-первых, различными условиями проведения эксперимента – в случае спектрофотометрических экспериментов белок находится в растворённом состоянии в кювете, а в случае биосенсорных экспериментов – ковалентно иммобилизован за аминокислотные группы на поверхности оптического чипа, что ограничивает его подвижность и способность в той или иной степени менять свою конформацию при связывании низкомолекулярных соединений. Во-вторых, отличаются сами принципы методов. Биосенсор, регистрируя факт взаимодействия, позволяет вычислить обобщённое значение K_D в ходе межмолекулярного взаимодействия, включающее в себя как связывание в активном центре цитохрома низкомолекулярного соединения, так и иных взаимодействий этих молекул. В то же время, спектрофотометрический эксперимент позволяет зарегистрировать непосредственно акт взаимодействия в активном центре фермента.

Биохимическое тестирование ингибирующего действия низкомолекулярных соединений на CYP51 человека.

Соединения, показавшие способность связываться с активным центром CYP51A1 и влиять на спиновое состояние атома железа гема, были проанализированы в реконструированной системе ферментной CYP51A1 на способность ингибировать его каталитическую активность. Было показано, что голотурин А, бетулафолиентриол, теасапонин, HD-1, и HD-2 способны ингибировать активность этого фермента. Капсикозин и PP1 не оказали ингибирующего действия в тестируемых концентрациях. В то же время, эти соединения способны связываться в активном центре CYP51A1, что было показано в ходе экспериментов по спектральному титрованию. Можно предположить, что в более высоких концентрациях данные соединения также будет обладать ингибирующим эффектом, но эти данные требуют подтверждения. Результаты действия низкомолекулярных соединений в высшей экспериментальной концентрации (50 мкМ) представлены в таблице 3.

Таб. 3. Результаты биохимического тестирования.

№ соединения	Соединение	% ингибирования CYP51A1 при концентрации соединения 50 мкМ
26	Голотурин А	100 ± ND
29	Бетулафолиентриол	26 ± 4
34	Теасапонин	54 ± 11
52	HD-1	31 ± 6
53	HD-2	31 ± 7

ND – получить значение не удалось.

Задача определить IC₅₀ не ставилась, однако, этот параметр можно оценить для данных соединений как находящийся в диапазоне 10⁻⁵–10⁻⁶ М.

Анализ термодинамических параметров взаимодействия низкомолекулярных соединений с иммобилизованным CYP51A1.

Были получены сенсограммы взаимодействия с иммобилизованным CYP51A1 5 соединений, снижающих активность CYP51A1, а также кетоконазола и ланостерола в диапазоне температур от 10 до 40 °С. Кроме того, для сравнения были получены те же данные для двух соединений, не обладающих ингибирующим эффектом: дигитонина, который не обладал способностью связываться в активном центре фермента, и PP1, который такую способность показал, но не оказал ингибирующего действия в концентрациях, использованных для анализа.

На рисунке 2 приведены температурные зависимости lnK_D от обратной температуры для

голотурина А, бетулофолиентриола, теасапонина, HD-1, HD-2 отобранных в результате биосенсорного и биохимического тестирования, а также кетоконазола. Кроме того приведены аналогичные графики для дигитонина и PP1.

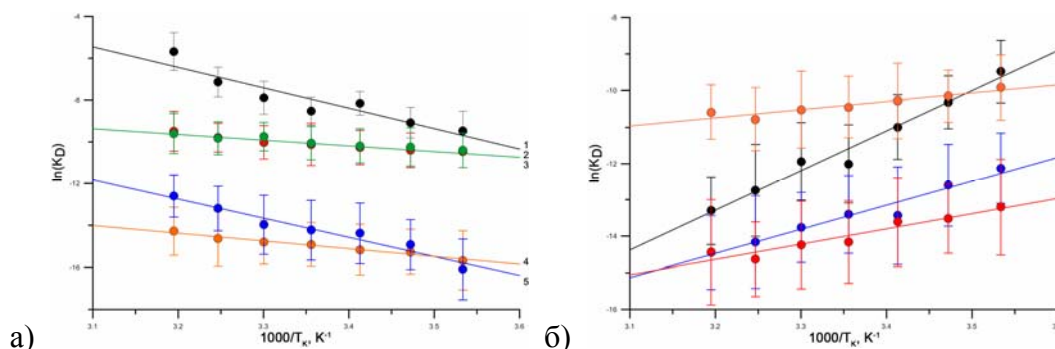


Рис. 2. а) Температурные зависимости $\ln K_D$ для теасапонина (1) и бетулофолиентриола (2), дигитонина (3), HD-1 (4), HD-2 (5). б) Температурные зависимости $\ln K_D$ для ланостерола (1), PP1 (2), голотурина А (3), кетоконазола (4).

На рисунке 3 представлены значения расчётов энтальпии и энтропии, полученные из 3-х независимых экспериментов, для формирования и распада комплексов CYP51A1 с низкомолекулярными соединениями.

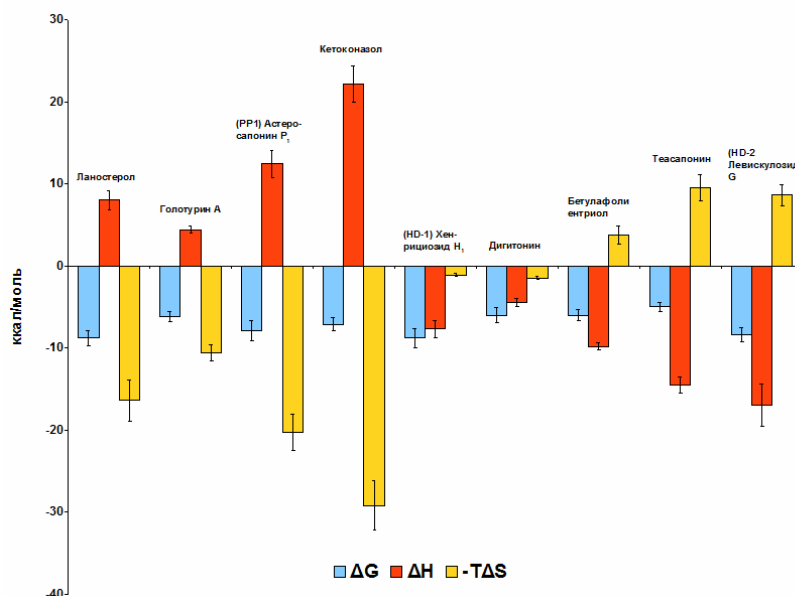


Рис. 3. Термодинамические параметры взаимодействия низкомолекулярных соединений с CYP51A1 при 298 К.

Для ланостерола голотурина А, PP1 наблюдается положительное изменение энтальпии (реакция эндотермическая) и энтропии, что выражено отрицательным значением параметра $-T\Delta S$. Для теасапонина, бетулафолиентриола, HD-2 отрицательное изменение энтальпии (экзотермическая реакция), отрицательное изменение энтропии, что выражается положительным значением параметра $-T\Delta S$. Для дигитонина и HD-1 наблюдается отрицательное изменение энтальпии и положительное, но не сильно выраженное изменение энтропии в ходе взаимодействия. Полученные значения позволяют говорить о том, что в ходе взаимодействия с CYP51A1 с ланостеролом, кетоконазолом, голотурином А, и PP1 ведущую

роль в распределении термодинамических параметров играют изменения структуры сольватной оболочки, окружающей молекулы белка и лиганда. А в случае взаимодействия молекулы теасапонина, бетулафоилентриола и HD-2 с CYP51A1 большой вклад вносят перераспределения в структуре водородных связей, многополярных и дисперсных сил, влияющих на молекулы, и связанных в первую очередь с параметром энтальпии. Для HD-1 и дигитонина, энтальпийный и энтропийный компонент оказывают равнозначное влияние на протекание процесса взаимодействия с CYP51A1.

Апробация разработанной тест-системы для анализа соединений, способных взаимодействовать с другими представителями семейства CYP51.

Для того, чтобы показать применимость представленной в работе тест-системы для анализа взаимодействий низкомолекулярных соединений с различными представителями цитохромов семейства P450(51), были проведены эксперименты с CYP51 *Candida albicans* (полученный гетерологической экспрессией в *E.Coli* резистентный к азолам штамм, содержащий мутации K-179-E, L-224-I, G-307-C, M-372-T, выявленные ранее у азол-резистентных штаммов *Candida albicans*, полученных от нескольких клиник республики Беларусь). Был проведён подбор оптимального иммобилизационного буфера для этого белка. В результате было получено, что таковым является 10 мМ ацетатный буфер с pH 5,0. Отдельные низкомолекулярные соединения из тестовой выборки (№№ 41-50 и ланостерол, взятый в качестве положительного контроля) были протестированы на способность взаимодействовать с иммобилизованным на оптическом чипе CM5 CYP51 *Candida albicans* в концентрации 30 мкМ.

Были определены равновесные константы диссоциации комплексов соединений с CYP51 *Candida albicans*, показавших уровень связывания более 15 RU, а также для HD-1 и HD-2, которые хотя и не показали уровень связывания, превышающий порог отсечения, но являлись ингибиторами CYP51A1 и изучить их взаимодействие с родственным человеческому белком *Candida albicans* представлялось целесообразным. Сравнение равновесных констант диссоциации комплексов данных низкомолекулярных соединений с цитохромами P450(51) человека и *Candida albicans* приведено на рисунке 4.

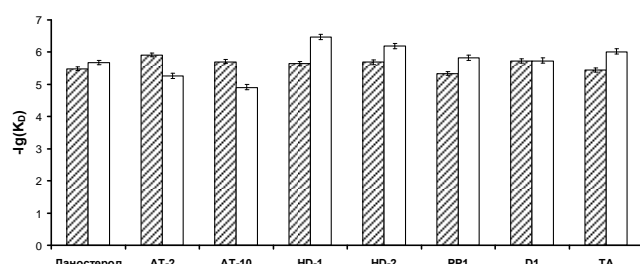


Рис. 4. Сравнение K_D комплексов низкомолекулярных соединений с CYP51 человека (\square) и *Candida albicans* (штриховка), полученных методом поверхностного плазмонного резонанса.

Как видно из рисунка 56, значения K_D комплексов ланостерола и D1 с CYP51 человека и *Candida albicans* имеют достаточно близкие значения, а для AT-2, AT-10, HD-1, HD-2, PP1 и

ТА наблюдаются различия в пределах порядка. Для соединений №№ 41, 43-45, 46, 49, 50 было проведено исследование на способность взаимодействовать с активным центром фермента методом спектрального титрования.

Было показано, что PP1, D1, TA (№№ 46, 50, 51) способны взаимодействовать с активным центром фермента и вызывать спектральный ответ первого типа. Как можно заметить, соединения, показавшие способность связываться с активным центром CYP51 человека и *Candida albicans* отличаются даже в пределах такой небольшой выборки соединений, несмотря на достаточно консервативную структуру их активных центров.

Результаты биосенсорных и спектральных экспериментов представлены в таблице 4.

Таб. 4. Константы диссоциации комплексов CYP51 *Candida albicans* с низкомолекулярными соединениями, полученные с помощью оптического биосенсора и спектрального титрования.

№ соединения	Соединение	K _D комплекса «соединение-белок», мкМ	
		Биосенсор	Спектральное титрование
41	AT-2	1,22 ± 0,04	ND
43	AT-10	2,01 ± 0,38	ND
44	HD-1	2,29 ± 0,34	ND
45	HD-2	2,60 ± 0,65	ND
46	PP1	0,74 ± 0,14	14,40 ± 2,70
50	D1	1,87 ± 0,36	3,29 ± 0,38
51	TA	3,66 ± 0,72	0,61 ± 0,05

Эти данные могут говорить о том, что данные соединения могут выступать в качестве конкурентных ингибиторов CYP51 *Candida albicans*, хотя это предположение требует подтверждения биохимическим анализом. Безусловно, важным является то, что взятый для эксперимента штамм белка, представлял собой генно-инженерный продукт, содержащий мутации, отвечающие за резистентность к азольной терапии нескольких штаммов паразитического гриба *Candida albicans*, полученных от пациентов в условиях стационара.

Также следует упомянуть, что соединения №№ 41-50 были получены от морских организмов типа Иглокожие и представляют собой структурные аналоги естественного субстрата CYP51 класса тритерпенов. Это позволяет говорить о том, что морские организмы могут стать обширным источником различных соединений, которые можно рассматривать в качестве отправной точки для разработок новых лекарственных препаратов *de novo*.

Выводы.

1) Создана биосенсорная тест-система для исследования взаимодействий низкомолекулярных соединений с цитохромами семейства P450(51). Система была апробирована на примере цитохрома P450(51) человека и цитохрома P450(51) азол-резистентного штамма *Candida albicans*.

2) Методом SPR исследованы взаимодействия 58 соединений из классов азолов, стероидов и тритерпенов с цитохромом P450(51) человека. Обнаружены 32 соединения, которые образуют устойчивые комплексы с целевым белком. Для 29 из них определены кинетические и равновесные параметры взаимодействия. Значения K_D комплексов лежат в диапазоне 0,27–140 мкМ.

3) Методом спектрального титрования исследовано взаимодействие 7 наиболее перспективных соединений с цитохромом P450(51) человека. Значения K_D комплексов сравнимы с данными SPR и лежат в диапазоне 0,03-78,1 мкМ. По данным биохимического тестирования из 7 соединений 5 оказались ингибиторами данного цитохрома. По предварительной оценке IC_{50} лежит в диапазоне 10^{-5} – 10^{-6} М.

4) Определены термодинамические параметры взаимодействия 9 тестовых соединений (ланостерола, голотурина А, бетулафолиентриола, теасапонина, хенрициозида Н1, левискулозида G, кетоконазола, дигитонина и атеросапонина P₁) с цитохромом P450(51) человека. Показано, что данные соединения можно разделить на три группы, где ведущую роль во взаимодействии с цитохромом играет: (1) энтропия (ланостерол, кетоконазол, голотурин А и атеросапонин P₁), (2) энтальпия (теасапонин, бетулафолиентриол, левискулозид G), (3) одновременно энтальпия и энтропия (дигитонин и хенрициозид Н1). Причём, распределение соединений по группам не коррелирует с их химической структурой и способностью ингибировать активность данного цитохрома.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Гнеденко О.В., Калужский Л.А., Мольнар А.А., Янцевич, А.В., Муха Д.В., Гилеп А.А., Усанов С.А., Стоник В.А., Иванов А.С., Лисица А.В., Арчаков А.И. SPR биосенсорная тест-система анализа взаимодействия низкомолекулярных соединений с цитохромом р450 51A1 (CYP51A1) человека // Биомедицинская химия. 2013. Т.59(4). С.388-398;
1 a. Gnedenko O.V., Kaluzhskiy L.A., Molnar A.A., Yantsevich A.V., Mukha D.V., Gilep A.A., Usanov S.A., Stonik V.A., Ivanov A.S., Lisitsa A.V., Archakov A.I. The SPR-based biosensor test system for analysis of small compounds interaction with human cytochrome P450 51A1 (CYP51A1) // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2013. V.7(3). P.187-195;
2. Калужский Л.А., Гнеденко О.В., Гилеп. А.А., Струшкевич Н.В., Шкель Т.В., Черновецкий М.А., Иванов А.С., Лисица А.В., Усанов С.А., Стоник В.А., Арчаков А.И. Поиск ингибиторов цитохрома P450(51) человека (CYP51A1): структурные аналоги ланостерола растительного и животного происхождения // Биомедицинская химия. 2014. Т.60(5). С.590-596.
3. Ershov P., Mezentsev Y., Gnedenko O., Mukha D., Yantsevich A., Britikov V., Kaluzhskiy L., Yablokov E., Molnar A., Ivanov A., Lisitsa A., Gilep A., Usanov S., Archakov A. Protein interactomics based on direct molecular fishing on paramagnetic particles: experimental simulation and SPR validation // Proteomics. 2012. V. 12(22). P. 3295-8. doi: 10.1002/pmic.201200135;
4. Ivanov A.S., Medvedev A., Ershov P., Molnar A., Mezentsev Y., Yablokov E., Kaluzhsky L., Gnedenko O., Buneeva O., Haidukevich I., Sergeev G., Lushchyk A., Yantsevich A., Medvedeva M., Kozin S., Popov I., Novikova S., Zgoda V., Gilep A., Usanov S., Lisitsa A., Archakov A. Protein interactomics based on direct molecular fishing on paramagnetic particles: Practical realization and further SPR validation // Proteomics. 2014. doi: 10.1002/pmic.201400117. [Epub ahead of print]
5. Калужский Л.А., Гнеденко О.В., Мольнар А.А., Иванов А.С., Усанов С.А., Арчаков А.И. Взаимодействие низкомолекулярных лигандов с цитохромом P450(51) человека // Материалы Первой международной интернет-конференции «Медицина в XXI веке: традиции и перспективы. ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». Казань. Россия. 12-15 марта 2012. С.95
6. Калужский Л.А., Гнеденко О.В., Мольнар А.А., Иванов А.С., Усанов С.А., Арчаков А.И. Оптико-биосенсорная тест-система для исследования взаимодействий низкомолекулярных соединений с цитохромом P450(51) человека // Материалы IV съезда биофизиков России. Нижний Новгород. Россия. 20-26 августа 2012. С.130;

7. Калужский Л.А., Яблоков Е.О., Гнеденко О.В., Мольнар А.А., Янцевич А.В., Муха Д.В., Гилеп А.А., Иванов А.С., Усанов С.А., Арчаков А.И. Влияние низкомолекулярных ингибиторов и субстратных аналогов цитохрома P450(51) человека на его взаимодействие с микросомальным цитохромом b5 человека // Медицинский Академический Журнал. Приложение. Материалы II всероссийской научной конференции молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия». Санкт-Петербург. Россия. 12-14 ноября 2012. С.269;

8. Шкель Т.В., Струшкевич Н.В., Диченко Я.В., Усанов С.А., Черновецкий М.А., Калужский Л.А., Иванчина Н.В., Кича А.А., Стоник В.А., Иванов А.С., Гилеп А.А. Структурно-функциональный анализ стерол-14 α -деметираз из азол-резистентных штаммов патогенных грибов // Успехи медицинской микологии. XII. Материалы VI Всероссийского конгресса по медицинской микологии. Москва. Россия. 8-10 апреля 2014. С.64-66;

9. Шкель Т.В., Василевская А.В., Усанов С.А., Черновецкий М.А., Лукьяненко И.Г., Стоник В.А., Калужский Л.А., Иванов А.С., Гилеп А.А. Молекулярный анализ стерол-14 α -деметираз патогенных грибов, вызывающих внутрибольничные инфекции // Материалы V Международной конференции «Химия, структура и функция биомолекул», Минск. Республика Беларусь. 4-6 июня 2014. С.204-205.

Работа выполнялась за счёт средств гранта РФФИ 11-04-01107-а «Исследование специфичности молекулярного узнавания в системе цитохрома P450(51) человека».