

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
БИОМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ В.Н. ОРЕХОВИЧА»

На правах рукописи

Калужский Леонид Александрович

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ С ЦИТОХРОМОМ P450(51) ЧЕЛОВЕКА

03.01.04 – Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Иванов А.С.

Москва 2014

1. Оглавление.

1. Оглавление.	2
1.1. Список использованных сокращений.	5
2. Введение.	6
2.1. Актуальность исследования.	6
2.2. Цель работы.	7
2.3. Задачи.	7
2.4. Научная новизна работы.	8
2.5. Научно-практическая ценность работы.	9
2.6. Апробация работы.	9
2.7. Личный вклад автора.	10
2.8. Публикации.	10
2.9. Структура и объём работы.	11
3. Обзор литературы.	13
3.1. Семейство CYP51.	13
3.2. Физиологическая роль CYP51.	14
3.3. Влияние структурной консервативности на функцию CYP51.	17
3.4. Антиатеросклеротические препараты.	22
3.4.1. Атеросклероз. Общие сведения.	22
3.4.2. Медикаментозная терапия атеросклероза.	24
3.5. Ингибиторы CYP.	26
3.5.1. Обратимые ингибиторы CYP.	27
3.5.2. Ингибирование CYP вследствие координации химических агентов с атомом железа гема.	27
3.5.3. Ингибирование CYP вследствие связывания химических агентов с атомом железа гема.	28
3.5.4. Ингибирование CYP в случае одновременной координации низкомолекулярных соединений с гемом и связывания их с липофильными	

регионами молекулы белка-мишени.	29
3.6. Ингибирование ферментов биосинтеза.	32
3.6.1. Ингибиторы CYP11A1.....	32
3.6.2. Ингибиторы ароматазы.....	33
3.6.3. Ингибиторы стерол-14 α -деметилазы (CYP51).....	39
3.7. Термодинамические и кинетические параметры взаимодействия лигандов с белком-мишенью.	44
3.8. Метод поверхностного плазмонного резонанса.	46
3.9. Метод спектрального титрования.....	50
3.10. Метод измерения активности CYP51A1 в восстановленной системе цитохрома.....	52
3.11. Электрохимический метод поиска потенциальных ингибиторов цитохромов.....	54
4. Материалы и методы.....	57
4.1. Химические реактивы.	57
4.2. Белки.....	57
4.3. Низкомолекулярные соединения.	58
4.4. Поверхностный плазмонный резонанс.	65
4.4.1. Подготовка оптического биосенсора к работе.	65
4.4.2. Подбор иммобилизационного буфера.....	65
4.4.3. Приготовление экспериментальных образцов низкомолекулярных соединений для анализа межмолекулярных взаимодействий в оптическом биосенсоре.	66
4.4.4. Иммобилизация CYP51 человека и <i>Candida albicans</i> на поверхности оптического чипа CM5.....	66
4.4.5. Анализ способности низкомолекулярных соединений взаимодействовать с CYP51 человека и <i>Candida albicans</i>	67
4.4.6. Регистрация кинетических и термодинамических параметров взаимодействий низкомолекулярных соединений с CYP51.	67

4.4.7. Обработка данных, полученный с помощью оптического биосенсора.	68
4.4.7.1. Рассчёт равновесной константы диссоциации.....	68
4.4.7.2. Рассчёт термодинамических параметров взаимодействия низкомолекулярных соединений с CYP51A1.....	70
4.4.7.3. Оценка качества фитирования.	71
4.5. Спектральное титрование.	72
4.5.1. Рассчёт константы диссоциации комплекса белка с низкомолекулярным соединением в экспериментах по спектральному титрованию.	72
4.6. Биохимическое тестирование на способность низкомолекулярных соединений ингибировать CYP51A1 человека.	73
5. Результаты и их обсуждение.	75
5.1. Подбор иммобилизационного буфера.....	75
5.2. Иммобилизация CYP51A1.	76
5.3. Анализ способности низкомолекулярных соединений взаимодействовать с CYP51 человека.....	77
5.4. Анализ аффинности взаимодействия низкомолекулярных соединений с CYP51A1.	79
5.5. Анализ связывания низкомолекулярных соединений в активном центре CYP51A1 методом спектрального титрования.	95
5.6. Биохимическое тестирование ингибирующего действия низкомолекулярных соединений на CYP51A1.....	97
5.7. Анализ термодинамических параметров взаимодействия низкомолекулярных соединений с иммобилизованным CYP51A1.	98
5.8. Апробация разработанной тест-системы для анализа соединений, способных взаимодействовать с другими представителями семейства CYP51.	107
6. Заключение.....	111
7. Выводы.	113
8. Благодарности.....	115
9. Список литературы.....	116

1.1. Список использованных сокращений.

CYP – цитохромы P450;

CYP51 – цитохромы P450(51);

CYP51A1 – цитохром P450(51) человека;

CPR – редуктаза цитохромов P450;

CYP11A1, P450_{scc} – 20,22-десмолаза;

FF-MAS – 4,4-диметил-5-холеста-8,14,24-триен-3-ол;

SPR – surface plasmon resonance, поверхностный плазмонный резонанс;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ГМГ-КоА редуктаза – 3-ОН-3-метилглутарил-коэнзим А редуктаза;

ЛП – липопroteины;

ЛНП – липопroteины низкой плотности;

ЛПП – липопroteины промежуточной плотности;

ЛОНП – липопroteины очень низкой плотности;

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат;

ХМ – хиломикроны.

2. Введение.

2.1. Актуальность исследования.

Цитохром P450(51) (P450(51), CYP51) является стерол-14- α -деметилазой и относится к 51 семейству цитохромов P450 [1]. Он является одним из ключевых ферментов биосинтеза холестерина у эукариот [2], катализируя реакцию окислительного удаления 14-альфа-метильной группы в молекуле ланостерола [3]. 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. Отложения формируются в виде атероматозных бляшек, а последующее разрастание в них соединительной ткани и кальциноз стенки сосуда приводят к деформации и сужению просвета вплоть до облитерации. 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 [4, 5]. Из этого числа более половины приходится на долю ишемической болезни сердца [6], наиболее частой причиной которой является атеросклеротические отложения в интима коронарных сосудов. Медикаментозная терапия этого заболевания в настоящее время основывается на применении препаратов 4-х групп: I – препятствующих всасыванию холестерина, II – снижающих синтез холестерина и триглицеридов в печени и уменьшающих их концентрацию в плазме крови, III – повышающих катаболизм и выведение атерогенных липидов и липопротеидов, IV – дополнительных средств. 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 к препаратам второй группы относятся ингибиторы 3-ОН-3-метилглутарил-КоА редуктазы (ГМГ-КоА редуктазы) (статины), производные фиброевой кислоты (фибраты), никотиновая кислота и препараты снижающие синтез стерола. Наибольшую эффективность среди препаратов данной группы показали статины [7, 8].

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 стероидных спиртов (стеролов). Представляется целесообразным обнаружить вещества, способные ингибировать синтез холестерина на более поздних стадиях. Данная работа была направлена на поиск новых ингибиторов цитохрома P450(51) (CYP51A1) человека среди низкомолекулярных соединений и базировалась на проведённых ранее исследованиях [9].

2.2. Цель работы.

Экспериментальное исследование молекулярных механизмов взаимодействия низкомолекулярных соединений из класса азолов, стероидов и тритерпенов с цитохромом P450(51) человека.

2.3. 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.

2.4. 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.

2.5. 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.

2.6. 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 2012, Санкт-Петербург, Россия;

- 4) VI Всероссийский конгресс по медицинской микологии. 8-10 апреля 2014, Москва, Россия.
- 5) V Международная конференция «Химия, структура и функция биомолекул». 4-6 июня 2014, Минск, Республика Беларусь.

2.7. Личный вклад автора.

Планирование всех экспериментов, анализ и интерпретация экспериментальных данных, формулировка теоретических 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», Минск, Республика Беларусь.

2.8. Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 работ, из них 2 статьи в ведущих рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК Минобрнауки России:

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;
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.

Методические наработки по иммобилизации мембранных белков были использованы в протеомных исследованиях и опубликованы в зарубежном журнале «Proteomics»:

1. 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;
2. Ivanov A.S., Medvedev A., Ershov P., Molnar A., Mezentsev Y., Yablokov E., Kaluzhsky L., Gnedenko O., Buneeva O., Haidukevich I., Sergeev G., Lushchik 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].

2.9. 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.

3. Обзор литературы.

3.1. Семейство CYP51.

Стерол-14- α -деметилаза известна как один из основных участников метаболического пути биосинтеза холестерина у эукариот [2]. Этот фермент находится под пристальным вниманием учёных, начиная с 1980-х годов [10, 11]. Химическая реакция, катализируемая этим ферментом была впервые описана у дрожжей в 1984 году (для вида *Saccharomyces cerevisiae*) [12]; последовавшее за этим определение первичной структуры данного фермента [13] позволило отнести стерол-14- α -деметилазы, к семейству CYP51 [14], входящему в суперсемейство цитохромов P450. В 1986 гомологи этих белков у млекопитающих были выделены из микросом печени крысы [15], а в 1996 первая стерол-14- α -деметилаза была обнаружена у растений (вид Сорго зерновое, *Sorghum bicolor*) [16], в 2000 была подтверждена гомологичность CYP51-подобного гена у *Mycobacterium tuberculosis* и эукариотических генов CYP51 [17], в 2007 году были определены вольт-амперные характеристики реакции восстановления CYP51 *Mycobacterium tuberculosis* [18], в 2010 году была определена кристаллическая структура CYP51A1 и молекулярная природа ингибирования этого фермента [19].

В настоящее время семейство цитохромов CYP51 включает белки, обнаруженные у разнообразных организмов, принадлежащих ко всем царствам биологического мира. Также, было показано, что несколько видов растений и грибов содержат несколько генов цитохромов CYP51 [14, 20]. По состоянию на сентябрь 2014 года в базе знаний «Uni Prot» находятся данные, подтверждённые экспертами, о 28 ферментах семейства CYP51. 4 белка принадлежат микобактериям, 24 – эукариотам, включая: 12 белков грибов, *mesangiospermae* – 4, трипаносом – 1, *mycetozoa* – 1, *boreoeutheria* – 6, среди которых принадлежащие *Bos taurus* (Дикий бык), *Sus scrofa* (Кабан), *Homo sapiens* (Человек разумный), *Mus musculus* (Мышь домовая), *Rattus norvegicus* (Серая крыса), *Macaca fascicularis*

(Макак-крабодед). Также в этой базе присутствуют ещё 1892 записи о цитохромах CYP51, однако, они пока не прошли проверку экспертами [21].

Причина существования гомологов генов ферментов CYP51 у одного биологического объекта и их основное назначение пока ещё остаются неизвестны, однако, было описано, что только один из двух генов *CYP51 Arabidópsis thaliána* (Резуховидка Таля, сем. *Капустные*) находится в активном состоянии, в то время как другой является псевдогеном [22]. Геном млекопитающих содержит только один ген CYP51, и пока ещё не функционирующие псевдогены CYP51 не были обнаружены.

Доля идентичных аминокислот в первичной последовательности ферментов семейства CYP51 в общем составляет около 30%, и это число сильно варьирует в зависимости от эволюционной близости биологических видов, которым принадлежат белки (например, для млекопитающих идентичность первичной последовательности составляет около 95%, для низших эукариотов – 41%, а наименьшее сходство наблюдается между белками, принадлежащих организмам из разных биологических царств – 23-34%). Интересным фактом является то, что для множественных генов одного организма первичная последовательность белка семейства CYP51 также может сильно различаться [23].

3.2. Физиологическая роль CYP51.

Несмотря на то, что уровень идентичности первичной последовательности для того, чтобы белок был включён в суперсемейство P450, должен быть больше 40%, стерол-14- α -деметилазы всех типов независимо от степени гомологии рассматриваются как члены одного семейства, поскольку они выполняют строго определённую функцию. Все изученные формы ферментов катализируют единственную стерео и регио-специфичную реакцию окислительного удаления 14- α -метильной группы у предшественников стеролов, образующихся при биосинтезе путём циклизации скваленового 2,3-эпоксида.

Реакция, катализируемая CYP51, протекает в три стадии, каждая из которых

требует наличия одной молекулы кислорода и двух эквивалентов НАДФН-производных [24]. В течение первых двух циклов, которые являются типичными для монооксигенирования, катализируемого цитохромами P450, 14- α -метильная группа последовательно переводится в 14- α -гидроксиметильную и 14- α -карбоксиальдегидную. На финальном этапе 14- α -карбоксиальдегидная группа удаляется с выделением муравьиной кислоты и одновременным образованием $\Delta^{14,15}$ двойной связи в стерольном ядре. Катализ расщепления С-С-связи более сложный, и было описано два возможных механизма его протекания: по принципу радикальной реакции или перегруппировки Байера-Виллигера [25, 26].

Продукты реакций, катализируемых стерол-14- α -деметилазами, являются промежуточными метаболитами в биохимическом пути, приводящем к образованию холестерина у животных, эргостерола у грибов и различных 24-алкилированных и олефинированных стеролов у растений, морских водорослей и простейших одноклеточных организмов [9, 27] (рис. 1).

Биосинтез стеролов имеет место в основном в эукариотических клетках (исключая насекомых и нематод, которые получают стеролы с пищей). В общем случае, данный метаболический путь протекает в эндоплазматическом ретикулуме, но также имеются сведения, что *Kinetoplastidae* могут синтезировать стеролы и в митохондриях [28]. Стеролы с высокой молекулярной массой, такие как холестерин, эргостерол, ситостерол (у растений) являются повсеместно встречающимися компонентами плазматических мембран, где они играют важнейшую структурную роль, обеспечивая регуляцию мембранной текучести и проницаемости, а также опосредованно модулируют активность и распределение по мембране интегральных белков, включая различные ферменты, ионные каналы и компоненты сигнальных путей [29]. Стеролы являются предшественниками для биоактивных молекул, таких как стероидные гормоны млекопитающих, брассиностероидные гормоны растений и экдистероиды насекомых, и, таким образом, служат регуляторами процессов развития.

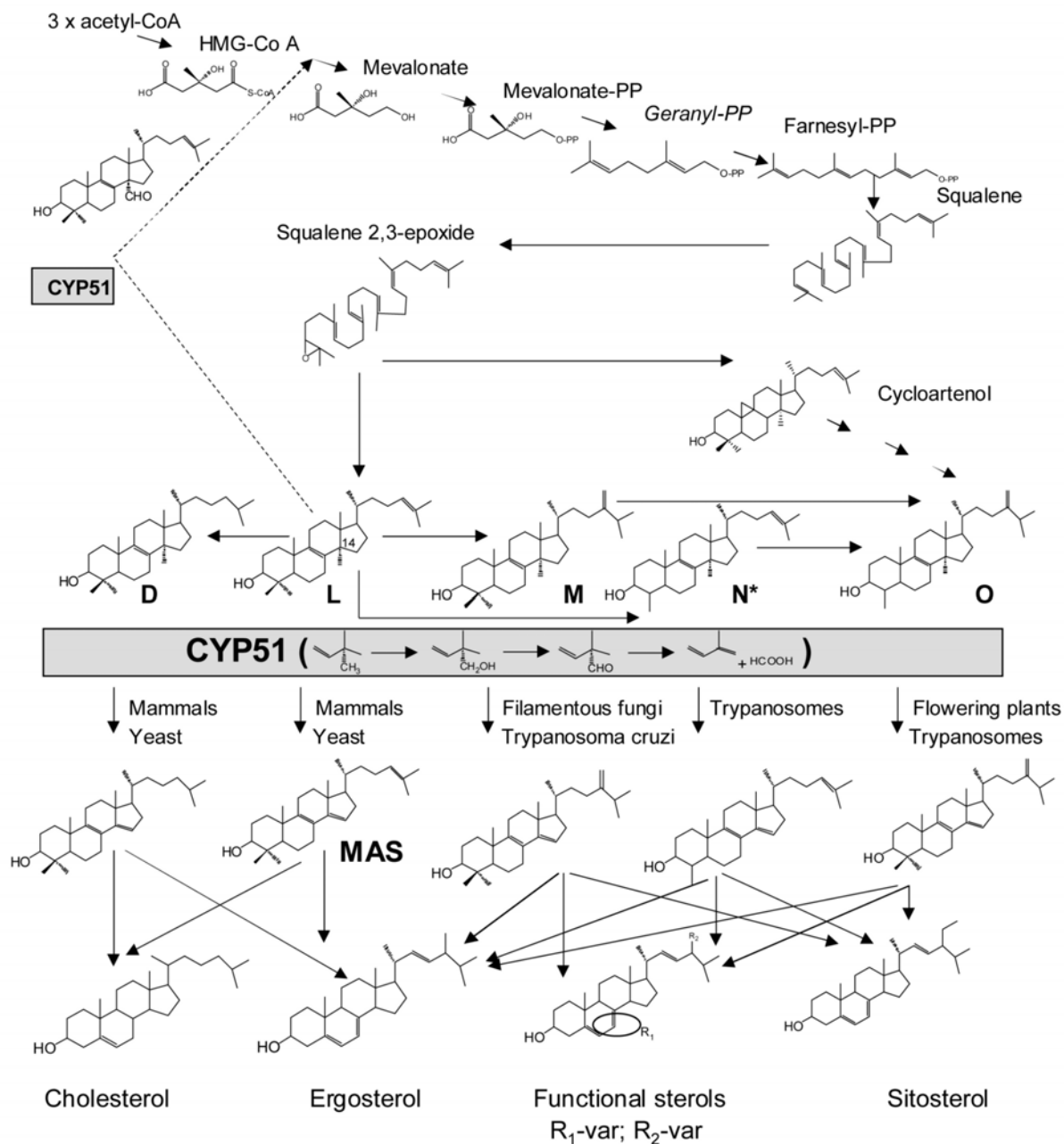


Рис. 1. Физиологическая роль CYP51 у различных живых организмов. D – 24,25-дигидроланостерол, L – ланостерол, M – метилendigидроланостерол, N – норланостерол, O – обтусифолиол [23].

В добавлении к тому, что реакция, катализируемая CYP51, является неотъемлемой частью весьма важного биосинтетического пути, она играет и другие роли. Так, у млекопитающих продукт одной из промежуточных реакций этого пути (производное получаемое при деметилировании 14- α -

карбоксиальдегида ланостерола), известный как регулятор последующего образования холестерина, может действовать как супрессор трансляции ГМГ-КоА-редуктазы [30]. Подобная регуляторная роль CYP51 особенно важна для *Trypanosomatida*, у которых реакция, субстратом которой является альдегидное производное ланостерола, может быть использована при паразитировании для переключения пути эндогенного образования стерола на более энергетически выгодное потребление экзогенных стерольных предшественников, которые паразит получает из крови млекопитающего-хозяина [31].

Наконец, у млекопитающих, будучи экспрессированным повсеместно во всех тканях, CYP51 избыточно экспрессируется в половых клетках. Интересно, что в сперматозоидах активная стерол-14- α -деметилаза и её электронный донор (редуктаза цитохромов P450) были описаны как белки, локализованные не только в эндоплазматическом ретикулуме, но и в комплексе Гольджи, а также на внешней мембране везикул, образуемых комплексом Гольджи, и называемых акросомами [32]. В тестикулах и фолликулярной жидкости продукты 14- α -деметиличирования ланостерола были описаны как вещества, играющие роль в мейозе (стеролы, активирующие мейоз) [33].

Как и для других микросомальных цитохромов P450, для эукариотических форм CYP51 необходим электронный донор-партнёр – цитохром P450 редуктаза, обеспечивающая перенос электронов с НАДФ·Н, кофакторами которой выступают флавинмоноклеотид и флавинадениндинуклеотид, причём сродство редуктазы к первому у фермента выше, чем ко второму в десятки раз [17, 34].

3.3. Влияние структурной консервативности на функцию CYP51.

В противоположность белкам лекарственного метаболизма, являющимся цитохромами P450, которые могут взаимодействовать с субстратами, имеющими огромное разнообразие химической структуры, CYP51 имеют очень узкую субстратную специфичность. Набор существующих субстратов ограничен пятью

природными соединениями 14- α -метилстеролов (ланостерол, 24,25-дигидроланостерол, 24-метилдигидроланостерол, обтусифолиол и 4- β -десметилланостерол). Сложный механизм реакции, катализируемой представителями CYP51 предполагает, что строго определённая геометрия субстрата необходима для его правильной ориентации в активном центре фермента в течение всех трёх стадий катализа. Таким образом, цитохромы CYP51 должны иметь общую конфигурацию их субстрат-связывающих карманов, которые, в свою очередь, независимо от низкой идентичности первичных последовательностей в семействе, требуют строгого аминокислотного единообразия.

Несмотря на это, с увеличением количества известных последовательностей для семейства CYP51 количество инвариантных аминокислотных остатков постепенно снижается, например с 2004 по 2007 год это количество уменьшилось с 40 [35] до 29. Семь из них являются глицинами, которые соответствуют тем аминокислотам в структуре CYP51 у *M. tuberculosis*, которые разделяют вторичные структурные элементы. Исходя из данных, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза, Lepesheva и Waterman сделали предположение о том, что они должны быть крайне важны для структуры CYP51, в целях обеспечения функционально важной конформационной пластичности [36].

Большинство других консервативных аминокислотных остатков в структуре белков CYP51 кластеризованы в семи регионах [37], образующих субстрат-распознающие сайты 1-5, которые окружают цистеин, отвечающий за координацию гема. В то время, как консервативная структура гем-связывающей области характерна для всех белков P450, высокая консервативность субстрат-распознающих сайтов наблюдается исключительно в семействе CYP51 [38]. Два из них – 1 и 4, как наиболее консервативные и наиболее изученные, могут быть признаны как отличительная черта для отнесения белка к семейству CYP51 (Рис. 2).

MT	ATP-FMTPIFCGCVVFDA : 91	MFACHHTSSG : 263
M.bovis	ATP-FMTPIFCGCVVFDA : 91	MFACHHTSSG : 263
M.smegmatis	ATP-FMTPIFCGCVVFDA : 92	MFACHHTSSG : 264
M.avium	ATP-FMTPIFCGCVVFDA : 90	MFACHHTSSG : 262
N.farcinica	ATP-FMKPIFCGCVVFDA : 91	MFACHHTSSG : 263
M.capsulatus	ATP-IMTPIFCGCVVFDA : 94	MFACHHTSSG : 264
S.chacoense	VYQ-FNVPTFCGCVVFDV : 122	LFACQHTSSI : 292
potato	VYQ-FNVPTFCGCVVFDV : 122	LFACQHTSSI : 292
tomato	VYQ-FNVPTFCGCVVFDV : 122	LFACQHTSSI : 292
tobacco	VYQ-FNVPTFCGCVVFDV : 122	LFACQHTSSI : 292
cotton	VYQ-FNVPTFCGCVVFDV : 121	LFACQHTSSI : 290
poplar	VYQ-FNVPTFCGCVVFDV : 114	LFACQHTSSI : 284
clover	VYQ-FNVPTFCGCVVFDV : 98	LFACQHTSSI : 268
M.truncatula	VYQ-FNVPTFCGCVVFDV : 161	LFACQHTSSI : 331
lotus	VYQ-FNVPTFCGCVVFDV : 109	LFACQHTSSI : 279
soybean	VYQ-FNVPTFCGCVVFDV : 121	LFACQHTSSI : 291
A.thaliana	VYQ-FNVPTFCGCVVFDV : 125	LFACQHTSSI : 295
onion	VYQ-FNVPTFCGCVVFDV : 123	LFACQHTSSI : 293
sorghum	VYR-FNVPTFCGCVVFDV : 126	LFACQHTSSI : 296
cane	VYK-FNVPTFCGCVVFDV : 89	LFACQHTSSI : 259
rice	VYK-FNVPTFCGCVVFDV : 122	LFACQHTSSI : 292
wheat	VYR-FNVPTFCGCVVFDV : 126	LFACQHTSSI : 296
barley	VYR-FNVPTFCGCVVFDV : 93	LFACQHTSSI : 263
corn	VYR-FTVPAFCGCVVFDV : 85	LFACQHTSSI : 255
D.discoidium	ATD-FVTDFCKGCVVYDS : 109	LFACQHTSSI : 283
T.brucei	VYS-FMVPTFCGCVVYAA : 118	MFACQHTSSI : 298
T.gambiense	VYS-FMVPTFCGCVVYAA : 118	MFACQHTSSI : 298
T.congolense	VYS-FMVPTFCGCVVYAA : 118	MFACQHTSSI : 298
T.vivax	VYA-FMVPTFCGCVVYAA : 118	MFACQHTSSI : 298
T.cruci	VYT-IMTPTFCGCVVYAA : 118	MFACQHTSSI : 298
L.major	VYS-FMVPTFCGCVVYAA : 117	MFACQHTSSI : 297
L.infantum	VYS-FMVPTFCGCVVYAA : 117	MFACQHTSSI : 297
pig	VYSRLTTPVFCGCVVYDV : 147	LLACQHTSST : 318
dog	VYSRLTTPVFCGCVVYDV : 147	LLACQHTSST : 318
human	VYSRLTTPVFCGCVVYDV : 147	LLACQHTSST : 318
bull	VYSRLTTPVFCGCVVYDV : 148	LLACQHTSST : 319
rat	VYGRLTTPVFCGCVVYDV : 147	LLACQHTSST : 318
mouse	VYGRLTTPVFCGCVVYDV : 130	LLACQHTSST : 301
chicken	VYSRLTTPVFCGCVVYDV : 139	LLACQHTSST : 310
frog	VYSRLTTPVFCGCVVYDV : 145	LLACQHTSST : 316
killifish	VYSRLTTPVFCGCVVYDV : 143	LLACQHTSST : 314
sergeant.major	VYSRLTTPVFCGCVVYDV : 141	LLACQHTSST : 312
O.latipes	VYSRLTTPVFCGCVVYDV : 87	LLACQHTSST : 257
zebrafish	VYARLTTPVFCGCVVYDV : 139	LLACQHTSST : 310
sea.urchi	VYSRLTTPVFCGCVVYDV : 138	LLACQHTSST : 308
C.albicans	AYKHLTTPVFCGCVVYDC : 134	LMGQHTSSA : 314
C.dubliniensis	AYKHLTTPVFCGCVVYDC : 134	LMGQHTSSA : 314
C.tropicalis	AYTHLTTPVFCGCVVYDC : 134	LMGQHTSSA : 314
C.krusei	AYTHLTTPVFCGCVVYDC : 80	LMGQHTSSA : 254
C.glabrata	AYSHLTTPVFCGCVVYDC : 143	LMGQHTSSA : 322
S.cerevisiae	AYAHLTTPVFCGCVVYDC : 142	LMGQHTSSA : 321
E.gossypii	AYTKLTTPVFCGCVVYDC : 140	LMGQHTSSA : 319
M.acuformis	IYTVLTTPVFCGCVVYDC : 138	LMAGQHSSSS : 314
M.yallundae	IYTVLTTPVFCGCVVYDC : 138	LMAGQHSSSS : 314
B.fuckeliana	IYTVLTTPVFCGCVVYDC : 138	LMAGQHSSSS : 315
M.fruticola	IYTVLTTPVFCGCVVYDC : 138	LMAGQHSSSS : 315
B.graminis	IYTVLTTPVFCGCVVYDC : 138	LMAGQHSSSS : 315
U.necator	IYTNLTTPVFCGCVVYDC : 138	LMAGQHSSSS : 315
M.graminicola	IYSPLTTPVFCGCVVYDC : 139	LMAGQHSSSA : 314
V.inaequalis	IYSPLTTPVFCGCVVYDC : 135	LMAGQHSSSS : 311
V.nashicola	IYSPLTTPVFCGCVVYDC : 135	LMAGQHSSSS : 311
P.digitatum	IYKGLTTPVFCGCVVYDC : 128	LMAGQHSSAS : 312
P.italicum	VYKGLTTPVFCGCVVYDC : 128	LMAGQHSSSA : 311
A.fumigatus	VYSPLTTPVFCGCVVYDC : 123	LMAGQHSSSS : 300
A.oryzae	IYSPLTTPVFCGCVVYDC : 121	LMAGQHSSSS : 296
A.nidulans	VYSPLTTPVFCGCVVYDC : 121	LMAGQHSSSS : 296
S.pombe	AYSHLTTPVFCGCVVYDI : 119	LMAGQHTSAA : 295
C.neoformans	AYTHLTTPVFCGCVVYDC : 147	LMAGQHTSSA : 324
P.chrysosporium	VYKGLTTPVFCGCVVYDC : 141	LMAGQHTSSA : 323
U.maydis	AYTHLTTPVFCGCVVYDV : 146	LMAGQHTSSA : 332
C.elegans	AYNHMTKYVFCGCVVYDA : 132	LFACQHTSAT : 304

YxxFLxxP xFGxxVxF/YD/a

GQ/hHT/sS

Рис. 2. Консервативность аминокислот в составе субстрат-распознающих сайтов 1 и 4 в структуре CYP51 [23].

Субстрат-распознающий сайт №1 (В'-спираль/В'/С-петли) образует

верхнюю поверхность субстрат-связывающей полости. В случае замены консервативных тирозина, фенилаланина и глицина в В'-петле наблюдается полная потеря активности у стерол-14- α -деметилазы *M. tuberculosis* и человека [35], а также было показано, что подобная замена значительно влияет на активность крысиного гомолога CYP51 (были изучены соответствующие тирозин-131 и фенилаланин-139 [39]). Другим примером служат мутации консервативного пролина-81 в CYP51 *M. tuberculosis* (в этой позиции пролин обнаружен у всех изученных организмов за исключением мицелиальных грибов *Cunninghamella elegans*, у которых вместо пролина обнаружен тирозин). В случае подобной мутации эффект будет сильно зависеть от замены: так, если произошла замена пролина-81 на аланин, то снижается экспрессия белка, однако увеличивается его активность, в то время как замена на короткий и полярный глицин не оказывает значительного влияния на экспрессию белка, однако, вызывает 10-ти кратное снижение активности и 5-ти кратное снижение способности связывать субстрат. В противоположность этому длинная гидрофобная боковая цепь лейцина увеличивает в два раза активность и субстратную специфичность [40].

В В'С-петле мутации замены валина в положениях 87 и 143 на аланин останавливает экспрессию CYP51 у микобактерий и сильно (более чем в 10 раз) снижает экспрессию человеческого фермента [35]. Эффект замены двух аминокислотных остатков (фенилаланина-89 и аспарагиновой кислоты-90) в этой петле, судя по всему, является зависимым от типа организма [35, 41].

Фенилаланин, описанный в положении 89 у CYP51 *M. tuberculosis*, представлен в этой позиции у всех CYP51 бактерий и грибов, но в других организмах в этой позиции находится тирозин. Мутации, изменяющие 89-й аминокислотный остаток у микобактерий вызывают инактивацию фермента, но замена в этом же положении у человека не оказывает каких-либо существенных эффектов на активность или взаимодействие с субстратами. Аналогично, мутация D90A (замена в 90-м положении аспарагиновой кислоты на аланин) инактивирует

микобактериальный CYP51, но мутант D132A человеческого гомолога частично сохраняет свою стерол-14- α -деметилазную активность [41]. Также было обнаружено, что аспарагиновая кислота в 132-м положении, являющаяся консервативной у большинства представителей CYP51, замещена на аланин во всех последовательностях белков CYP51 трипаносом. Предполагается также, что вышеупомянутая мутация, изученная на микобактериях и человеческом цитохроме 51, должна встречаться в природе [23]. CYP51 *M. tuberculosis* является единственным известным P450, в структуре которого В'С-петля находится в открытой конформации. Возможно, эта конформация представляет собой канал, через который стеролы попадают в активный центр [42]. Таким образом, в традиционных представлениях о структуре P450, CYP51 микобактерий является единственным представителем суперсемейства с данными о том, что субстрат поступает с верхней поверхности, а не фронтальной.

Субстрат-распознающий сайт №4 локализован в С-концевой части I-спирали молекулы P450, образующей правую стенку дистальной поверхности субстрат-связывающей полости. Этот регион содержит уникальный триплет семейства CYP51 – гистидин-треонин(серин)-серин. Роль каждого из этих аминокислотных остатков была изучена на крысином CYP51 [39, 43]. Первый и последний остаток в триплете являются консервативными во всём семействе CYP51, в то время как треонин в середине триплета, известный как «консервативный треонин» [44] в большинстве белков P450, замещён на серин в ряде последовательностей CYP51, принадлежащих мицелиальным грибам [23].

Исследования мутагенеза у крыс показали, что замена треонина-315 на серин оказывает слабый эффект на фермент, в то время как замена на другие аминокислоты (валин, лизин или аспарагин) в данном положении приводит к потере способности распознавания субстрата. В противоположность сказанному, серин-316, который консервативен во всём семействе CYP51, может быть заменён на неполярный аланин без последствий, в то время как более длинная, или

полярная боковая цепь аминокислоты, находящаяся в этой области, оказывает сильное негативное влияние на активность фермента. В положении гистидина, описанного в триплете, консервативном во всём семействе CYP51, в большинстве других цитохромов P450 обнаружена кислая аминокислота [45]. При этом мутация H314D в крысином цитохроме 51 приводит к более чем шестикратному снижению активности фермента. Было описано, что у микобактерий туберкулёза белки CYP51 с заменой H259D показывают только 5% активность по сравнению с диким типом, а замена в этом же положении на аспарагин приводит к полной потере активности. А мутация по консервативному глицину-257 приводит к разрешению I-спирали на два спиралевидных сегмента и также инактивирует CYP51 как стерол-14- α -деметилазу [23].

Таким образом, два мотива: -YxxF(L)xxPxFGxF(Y)D(A)- в субстрат-распознающем сайте №1 и -GQ(H)T(S)S- в субстрат-распознающем сайте №4 – могут быть использованы для идентификации последовательности цитохрома P450 как члена семейства CYP51, а видо-специфичный остаток F(L) в B'-спирали (фенилаланина у растений и лейцина у животных и грибов) позволяет предсказать избирательность к субстрату (моно- или диметилу по C4-атому) новых последовательностей стерол-14- α -деметилаз [23].

3.4. Антиатеросклеротические препараты.

3.4.1. Атеросклероз. Общие сведения.

Атеросклероз является наиболее распространённым хроническим заболеванием артерий эластического и мышечно-эластического типа, сопровождающимся формированием одиночных и множественных очагов липидных, главным образом холестериновых отложений, т.н. атероматозных бляшек, во внутренней оболочке (интима) артерий. Последующее за этим разрастание в интима соединительной ткани (склерозирование) и кальциноз стенки сосуда приводят к медленно прогрессирующей деформации с

последующим сужением просвета сосуда вплоть до полного запустевания (облитерации) артерии, что вызывает, таким образом, хроническую, медленно нарастающую недостаточность кровоснабжения органа, питаемого поражённой артерией. Также возможна острая закупорка сосуда (окклюзия) либо тромбом, либо (что происходит значительно реже) содержимым распавшейся атероматозной бляшки, либо и тем и другим одновременно, что в итоге ведёт к формированию очагов некроза (развивается инфаркт) или гангрены в данном органе.

Ведущим механизмом развития атеросклероза является нарушение липидного обмена. Как известно, в плазме крови липиды находятся в составе сложных комплексов – липопротеинов, которые обеспечивают транспорт липидов до целевых органов. В случае избыточного накопления липопротеинов в артериальной стенке, происходит развитие липоидоза, что является ключевым моментом для начала развития атеросклеротических процессов. Среди липопротеинов выделяют пять фракций: липопротеины очень низкой плотности (ЛОНП), липопротеины низкой плотности (ЛНП) (атерогенные, вносят наибольший вклад в транспорт холестерина к периферическим органам и тканям), липопротеины промежуточной плотности (ЛПП), липопротеины высокой плотности (антиатерогенные, вносят наибольший вклад в транспорт холестерина от периферических органов и тканей в печень), хиломикроны (ХМ).

У больных ишемической болезнью сердца, атеросклерозом мозговых и периферических артерий чаще всего наблюдаются следующие особенности нарушений липидного спектра крови: общий холестерин умеренно повышен, холестерин липопротеинов низкой плотности значительно повышен, присутствуют липопротеины низкой плотности В-типа, холестерин липопротеинов высокой плотности снижен или находится на нижней границе нормы. В случае, когда при анализе выявляется подобная картина – это требует незамедлительного начала медикаментозной коррекции [46].

3.4.2. Медикаментозная терапия атеросклероза.

Медикаментозную терапию начинают у лиц с высоким и очень высоким риском развития фатальных осложнений одновременно с немедикаментозными мероприятиями по профилактике. К средствам, нормализующим липидный обмен, относятся:

1. ингибиторы фермента ГМГ-КоА редуктазы (статины)
2. секвестранты желчных кислот (смолы) (в России в настоящий момент не применяются)
3. производные фиброевой кислоты (фибраты)
4. никотиновая кислота
5. ингибиторы абсорбции холестерина в кишечнике
6. полиненасыщенные жирные кислоты

Статины являются ингибиторами фермента ГМГ-КоА редуктазы, одного из ключевых ферментов синтеза холестерина. Снижение внутриклеточного холестерина приводит к увеличению мембранных рецепторов к ЛНП у гепатоцитов, что повышает связывание и выведение из кровотока ЛНП, таким образом, снижая концентрацию холестерина в крови. Наряду с гиполипидемическим эффектом статины обладают плеiotропическим действием, улучшая функционирование эндотелия, снижая содержание С-реактивного белка, подавляя агрегацию тромбоцитов, а также пролиферативную активность гладкомышечных клеток. 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).

Фибраты являются антагонистами подкласса ядерных рецепторов,

активация которых усиливает процессы в ядре клетки, в частности, регулирующие метаболизм липопротеинов, синтез апобелков, окисление жирных кислот. Реализация этих механизмов приводит к активации липопротеидлипаз плазмы и печени, ферментов, регулирующих гидролиз ХМ, ЛОНП, ЛПП, что, в свою очередь, снижает их уровень в плазме крови. Терапия фибратами сопровождается повышением концентрации в крови холестерина, связанного с ЛВП, что также является хорошим прогностическим фактором. В рандомизированных клинических исследованиях было показано, что фибраты сокращают смертность от сердечно-сосудистых заболеваний, однако, количество данных не столь велико, как для статинов.

Механизмом действия никотиновой кислоты является сокращение синтеза ЛОНП в печени и частичная блокировка высвобождения жирных кислот из жировой ткани, что создаёт их дефицит в плазме.

Ингибиторы абсорбции холестерина селективно ингибируют абсорбцию пищевого холестерина, поступающего с желчью, в щёточной кайме ворсинок тонкого кишечника, что ведёт к снижению поступления холестерина из кишечника в печень и уровня содержания холестерина в гепатоцитах, а также повышению клиренса холестерина из плазмы крови [46].

Одним из перспективных потенциальных путей для снижения уровня холестерина является ингибирование фермента CYP51A1, т.к. этот фермент является ключевым в биосинтезе стеролов. В то же время, препараты, ингибирующие CYP51A1 имеет преимущество перед действующими на ГМГ-КоА редуктазу, т.к. блокирование биосинтеза холестерина в этом случае происходит на более поздних этапах, вследствие чего не так сильно страдают метаболические пути, в которых принимают участие промежуточные соединения пути биосинтеза холестерина. В работах Worner и соавт. [47], а также Monostory и соавт. [48] было показано, что LEK-935, ингибитор CYP51A1, оказывал значительно менее выраженное влияние на экспрессию различных физиологически значимых белков

в гепатоцитах человека по сравнению с розувастатином и аторвастатином.

3.5. Ингибиторы CYP

Одновременно с тем, что CYP51 является интересным объектом для фундаментальных исследований цитохромов P450, этот класс ферментов также имеет большое практическое значение, как мишень для потенциальных лекарств. Все вещества, способные взаимодействовать с цитохромами P450 подразделяются на два типа в зависимости от спектральных особенностей этого взаимодействия: к первому типу лигандов, для которого характерно наличие в дифференциальных спектрах максимума поглощения в области длины волны света около 385-390 нм и минимума в области 420 нм, относятся многие алифатические и ароматические углеводороды, третичные амины, алициклические соединения, многие из которых являются субстратами микросомальной гидроксилирующей системы; ко второму, для которого характерны максимум поглощения около 420-425 нм и минимум около 390 нм, относятся азолы, спирты и карбонилсодержащие соединения [49].

В каталитической реакции цитохромов P450 есть три стадии, которые могут стать мишенью для ингибирования. Это связывание субстрата с молекулой фермента, связывание молекулярного кислорода для передачи электрона и сам каталитический акт окисления субстрата. Ингибиторы цитохромов P450 можно разделить на три группы соединений. Это вещества, которые могут обратимо связываться с молекулой цитохрома, формировать псевдонеобратимые комплексы с железом гема или способные необратимо связываться с молекулой цитохрома или функциональной группой гема, а также ускорять распад или окислительную деградацию простетической группы молекулы цитохрома. Соединения, которые нарушают катализ, предотвращая сам акт окисления субстрата, представлены главным образом конкурентными и не конкурентными ингибиторами. Соединения, которые влияют на процесс передачи электрона представлены главным образом необратимыми и псевдонеобратимыми ингибиторами. Среди таких соединений много так называемых ингибиторов-самоубийц [50-58].

3.5.1. Обратимые ингибиторы CYP.

Обратимые ингибиторы конкурируют с субстратом в связывании в области активного центра и являются соединениями, которые связываются с гидрофобными областями активного центра, координируются с атомом железа гема или образуют специфические водородные или ионные связи с остатками аминокислот, входящих в состав активного центра фермента [50-56]. Первый механизм, при котором ингибитор просто конкурирует с субстратом за место связывания в липофильном домене активного центра, часто наблюдается в случае, когда два субстрата конкурируют между собой за одну молекулу изоформы цитохрома P450. Ярким примером подобных взаимодействия является взаимное ингибирование бензолового и толуолового метаболизма [59]. Этот вариант ингибирования обычно не слишком эффективен, но может вызывать физиологически и клинически значимые эффекты [60].

3.5.2. Ингибирование CYP вследствие координации химических агентов с атомом железа гема.

Прочное связывание соединения с пентакоординированным атомом железа в ферментах суперсемейства P450 или замещение слабосвязанного соединения в гексакоординированных комплексах атома железа, вызывает спиновый переход атома железа из высокоспинового в низкоспиновое состояние. Это смещение характеризуется т.н. «2-м типом» спектра поглощения и максимумом поглощения (пик Сорета) при длине волны около 420-425 нм и минимумом около 390-405 нм [49, 61-64]. Изменение red-ox потенциала фермента, связанное со спиновым состоянием железа, приводит к тому, что редуктаза P450 перестаёт восстанавливать фермент [64, 65]. Такое изменение восстановительного потенциала, также как и реальное замещение шестой координационной связи атома железа, лежит в основе механизма ингибирования и характерно для соединений, способных прочно связываться с атомом железа. Примером таких соединений могут служить цианиды и другие ионные соединения [66, 67]. Три

положительных заряда атома железа компенсируются в железосодержащих гемопротеинах тремя отрицательными зарядами их постоянных лигандов (двумя порфириновыми азотами и тиолятным ионом), но в восстановленном состоянии имеет место дисбаланс между тремя отрицательными зарядами и только двумя положительными зарядами железа. Цианидный ион, имеющий отрицательный заряд, более предпочтительно связывается с атомом железом цитохромов P450, чем с миоглобином, благодаря тому, что тиольные соединения, связанные с железом, обеспечивают более высокую электронную плотность чем имидазол-содержащие, которые присутствуют в миоглобине [68]. Хелатированию ионных лигандов также противодействует липофильная природа активного центра цитохромов [69]. Кроме этого цитохромы P450 также могут быть ингибированы оксидом азота (NO). Эта молекула участвует во многих физиологических и патологических процессах. Сам акт ингибирования включает обратимое связывание атома азота с железом гема, но это замещение естественного лиганда является зависимым от времени, и была описана необратимая инактивация фермента оксидом азота [70-72]. Ингибирование эндогенно-образованным NO цитохромов P450 также принимает участие в механизмах метаболизма, например, образовании эйкозаноидов и стеролов [73, 74].

3.5.3. Ингибирование CYP вследствие связывания химических агентов с атомом железа гема.

В простейшем примере ингибирование посредством связывания соединения с атомом железа гема представлено взаимодействием фермента с монооксидом углерода (CO), нейтральным соединением, которое связывается исключительно с восстановленной формой P450. Связывание CO включает передачу электронов от атома углерода на атом железа через сигма-орбиталь, наряду с обратной передачей электронов от π -орбиталей атома железа на пустые π -орбитали CO, препятствующие образованию комплекса [75]. Цитохромы P450 были названы именно так в том числе и потому, что их комплексы с CO имеют максимум

спектра поглощения при длине волны примерно 450 нм [76]. Ингибирование монооксидом углерода является характерным признаком процессов, катализируемых цитохромами P450, хотя наблюдается различная чувствительность среди разных изоформ этих ферментов [77], хотя некоторые реакции, катализируемые P450, не чувствительны к действию СО [78-80]. В частности, чувствительность ароматазы и CYP11A1 к ингибирующему действию монооксида углерода сильно снижается, когда фермент изменяет конформацию, и СО становится неотъемлемой частью общего комплекса в ходе многоступенчатой каталитической реакции [81-83]. Среди цитохромов P450 печени человека, чувствительность различных семейств к СО от большей к меньшей может быть представлена следующим рядом: 2D > 2C > 3A [84].

3.5.4. Ингибирование CYP в случае одновременной координации низкомолекулярных соединений с гемом и связывания их с липофильными регионами молекулы белка-мишени.

Соединения, которые связываются и с липофильными регионами активного центра, и с атомом железа гема (рис. 3) являются намного более сильными ингибиторами активности цитохромов P450, чем соединения, которые могут связываться с чем-то одним. Эффективность таких соединений в качестве ингибиторов P450 определяется как их гидрофобными характеристиками, так и прочностью связи с атомом железа гема. Такие соединения как спирты, эфиры, кетоны, лактоны и другие, при связывании которых кислородный атом координируется с железом, или же соединения действующие посредством стабилизации связывания атома железа с молекулами воды, обладают меньшей прочностью связи и проявляют менее выраженную ингибирующую активность [63, 83, 85-89]. Максимум Сорета таких комплексов наблюдается при примерно 415 нм [60, 63]. При этом, соединения, которые прочно взаимодействуют и с белковой, и с гемовой частью фермента, часто являются эффективными обратимыми ингибиторами [50-56]. Взаимодействие цитохрома с подобными

ингибиторами характеризуется «II типом» спектра поглощения с максимумом Сорета при примерно 420 нм [61, 63, 90, 91].

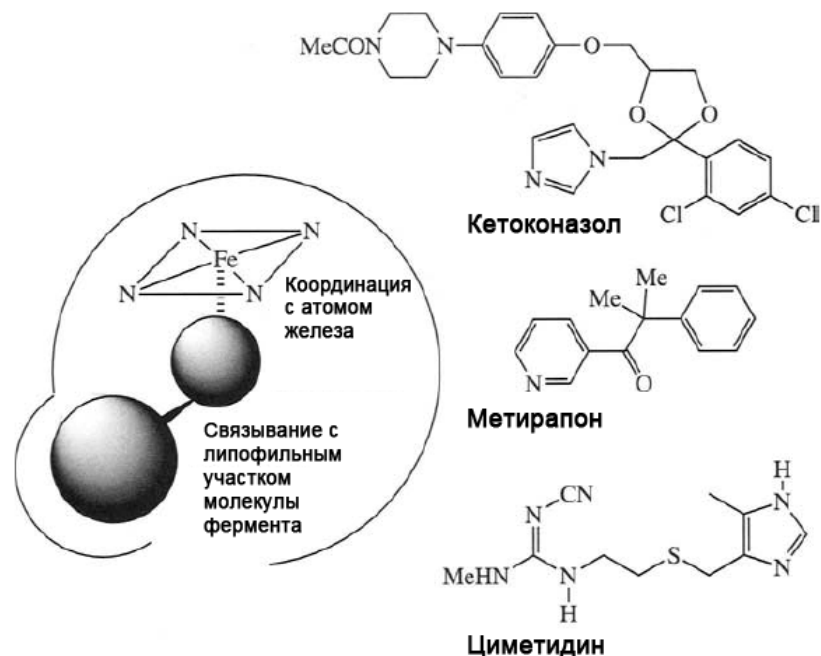


Рис. 3. Схема и примеры соединений с одновременной координацией с атомом железа гема и липофильным участком молекулы фермента [85 с изм.].

Химические структуры таких сильных ингибиторов обычно несут азот-содержащие алифатические или ароматические функциональные группы. Ранее было описано, что остатки пиридина, имидазола и триазола показывают ингибирующую активность для ряда ферментов суперсемейства цитохромов P450 [50]. Метирапон (рис. 3), один из первых описанных ингибиторов P450, который начал широко использоваться, изначально позиционировался как ингибитор 11 β -гидроксилазы, фермента, который катализирует финальную реакцию биосинтеза кортизола [92]. Такая ингибирующая активность позволила использовать метирапон при лечении гиперкортицизма (синдрома Кушинга) и других гормональных патологий [93]. Особенности, отвечающие за ингибирующую способность метирапона и других азот-содержащих гетероциклов, характерны для большинства обратимых ингибиторов: внутреннее сродство электронной пары атома азота к атому железа гема, степень с которой внутреннее сродство

ингибитора к гемовому железу определяется стерическими взаимодействиями молекулы белка с заместителями ингибитора [94, 95], липофильность участка молекулы ингибитора, который не участвует во взаимодействии с белком-мишенью [69, 96], а также соответствие между трёхмерными структурами ингибитора и активного центра фермента. Примером сочетанного эффекта всех этих условий, когда случайное связывание, обусловленное липофильными взаимодействиями, приводит в итоге к координации соединения с атомом железа гема, может служить тот факт, что бензол и имидазол по отдельности являются слабыми ингибиторами, но если их соединяют вместе в одну молекулу фенилимидазола, она получает мощную ингибирующую способность [94].

Изучение различных модификаций этих структурных особенностей низкомолекулярных соединений привели к тому, что азольные соединения, такие как кетоконазол, получили широкое терапевтическое применение как противогрибковые препараты и компоненты противораковой химиотерапии [51]. С другой стороны, похожие изменения в циметидине отвечают за лекарственные взаимодействия, которые приводят к ингибированию метаболизма совместно введённых пациенту лекарств. Подобный побочный эффект стал основой для поиска не содержащих имидазол H₂-антагонистов, у которых он не был бы выражен [86, 97]. В настоящий момент продолжаются работы по увеличению ингибирующей активности и избирательной специфичности метирапона, аминоглютетимида и других классических ингибиторов. Так, например, проводились клинические исследования пиридиламиноглютетимида, CGS16949A, CGS1832B, R-76713 и других соединений [51]. В области противогрибковой терапии подобные научные исследования проводились для улучшения эффективной химической структуры на основе миконазола, флуконазола, саперконазола, теконазола, которые являются ингибиторами стерол-14-альфа-деметилаз [51].

3.6. Ингибирование ферментов биосинтеза.

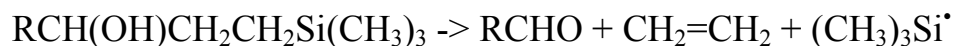
В нескольких комплексных обзорных работах обсуждалась потенциальная клиническая значимость и возможности применения ингибиторов ферментов P450, участвующих в биосинтезе различных соединений [51, 98-100].

3.6.1. Ингибиторы CYP11A1.

CYP11A1 катализирует три окислительных стадии, необходимые для удаления боковой цепи холестерина. Рациональный подход в разработке ингибиторов CYP11A1 основывается на внесении амино [101-104] и тиоловых [105] групп в боковую цепь холестерина в позициях, которые при взаимодействии соединения с ферментом будут способствовать их координации с гемовым железом, приводя таким образом к обратимому ингибированию. Константа диссоциации подобных комплексов «CYP11A1-низкомолекулярное соединение» колеблется в диапазоне 25-700 нМ. Так был получен, например, (22R)-22-аминохолестерин, один из наиболее мощных ингибиторов цитохрома CYP11A1 [104]. У этого соединения было произведено замещение первой гидроксильной группы, каталитически вставленной в боковую цепь холестерина, на аминную группу. Стереохимия этой вставки является критически важной для появления способности ингибировать CYP11A1, потому что (22S)-22-аминохолестерин связывается с CYP11A1 в 1000 раз слабее ($K_i = 13$ мкМ), хотя аминогруппа и находится у соответствующего атома углерода [104].

Также были описаны различные необратимые ингибиторы CYP11A1, влияющие на сам процесс катализа, такие как аналоги прегненедиола, несущие ацетиленовую функциональную группу, присоединённую к боковой цепи [106-108]. Наряду с этим исследования показали, что замена в боковой цепи у углеродов далее C-23 у 20-гидроксихолестерина на триметилсилильный остаток также приводит к появлению ингибирующей активности. В модельных экспериментах было показано, что монозамещённый 3-триметилсилил-1-пропанол

окисляется различными химическими агентами до этилена, триметилсилил-радикала и альдегида [109]:



Если описанная химическая модель соответствует действительности, то это означает, что CYP11A1 может быть ингибирован взаимодействием фермента с радикалом триметилсилила или, что возможно в меньшей степени, посредством окисления этилена, которое является отправной точкой для изменения числа оборотов фермента. Интересным вариантом ингибирования акта катализа является (20S)-22-нор-тиахолестерин, у которого сера, замещающая углерод в позиции 22, окисляется CYP11A1 до сульфоксида, проявляющего сильную, но обратимую ингибирующую активность по отношению к этому ферменту [105, 110, 111].

3.6.2. Ингибиторы ароматазы.

Ароматаза отвечает за превращение андрогенов в эстрогены посредством трёхстадийной каталитической реакции. Конкурентные ингибиторы этого фермента, наряду с действующими на механизм катализа соединениями применяются для лечения эстроген-зависимых злокачественных новообразований грудных желёз [51, 112-117], доброкачественной гиперплазии простаты [118, 119], а также имеют некоторый потенциал в качестве препаратов, используемых при инфаркте миокарда [120]. Аминоглутентимид, соединение, способное ингибировать ароматазу, применялся в терапии гормон-зависимых метастазирующих карцином молочных желёз, однако выявленные в ходе применения побочные эффекты, обусловленные в первую очередь ингибированием CYP11A1, не позволили ему получить широкое распространение [121-123]. Было показано, что замена аминифенильной группы в аминоглутентимиде на пиридиновый остаток приводит к образованию соединения, способного ингибировать ароматазу, но не CYP11A1 [123]. Избирательное действие на ароматазу, а не на CYP11A1 авторы пытались

объяснить через различия в локализации азота пиридинового остатка в активных сайтах ароматазы и CYP11A1, которые в одном случае приводит к возникновению ингибирующего эффекта, а в другом таковой отсутствует. Интересно заметить, что аналог аминоклутентимида, несущий азот на противоположном конце, является более мощным ингибитором CYP11A1, чем клутентимид, но проявляет меньшую ингибирующую активность по отношению к ароматазе [124]. Авторами этих исследований было высказано мнение о том, что метильная группа в 19-м и углерод в 22-м положении у боковой цепи стерола находятся на расстоянии, приблизительно равным размерам молекулы аминоклутентимида. Поэтому, они сделали предположение, что аминоклутентимид, связанный с активными центрами ароматазы и CYP11A1, имеет схожую ориентацию с естественным субстратом этих ферментов, а локализация атома азота обуславливает различную ингибирующую активность аминоклутентимида и его аналога.

Кроме того, были разработаны несколько сильных ингибиторов ароматазы, эффект которых основывается на схожей с имидазолом химической структуре, позволяющей обеспечить взаимодействие атома азота с железом гема. Наиболее перспективным среди них для лечения рака молочных желёз показали себя фадрозол и его аналог гемисукцинат бис-(псианофенил)-имидазо-1-ил-метана [124]. Оба этих соединения избирательно ингибируют ароматазу в гораздо большей степени, чем CYP11A1, CYP21 или CYP11B [125, 126]. Фадрозол также способен ингибировать 18-гидроксилазу, участвующую в образовании альдостерона у крыс, но в гораздо меньшей степени, чем было показано для его аналогов [127]. Во время проведения фазы 1 клинических испытаний фадрозола было обнаружено, что он обладает выраженной способностью ингибировать биосинтез эстрогенов у женщин с поздними стадиями рака груди в период постменопаузы [126, 127]. Также было описано, что этот препарат хорошо переносился пациентами, даже в максимально эффективных дозировках, и не изменял в значимой степени концентрации кортизола, андростендиона, тестостерона и альдостерона [126-128]. Однако, эффект фадрозола может быть

подавлен летрозолом, нестероидным ингибитором ароматазы, который показал более выраженный эффект, чем фадрозол, при применении в терапии пациенток в период постменопаузы с поздними стадиями рака груди [129, 130]. Ещё один селективный ингибитор ароматазы 6[(4-хлорфенил)(1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил]-1-метил-1 H-бензотриазол показал в экспериментах очень выраженную способность ингибировать ароматазу плаценты человека [131]. Его (+)-энантиомер показал меньшее значение IC_{50} чем (-)-энантиомер в случае действия на плацентарную ароматазу и не проявлял ингибирующей активности на другие ферменты биосинтеза стероидов или цитохромы P450 микросом печени при концентрациях, превышающих IC_{50} для ароматазы в 1000 раз. [132]. Ещё несколько других нестероидных соединений были созданы как оригинальные селективные ингибиторы ароматазы, среди них можно упомянуть анастрозол, 4-имидазолилфлаван, индолин и т. п. [133, 134]. Анастрозол, кроме всего прочего, был утверждён в США и ряде других стран как компонент адъювантной терапии пациенток в период постменопаузы с гормон-чувствительным раком молочных желёз в ранней стадии [135, 136]. В ходе различных исследований сильные конкурентные ингибиторы ароматазы стероидной природы были получены путём замены в положении C-19 метильной группы на серо- или азот-содержащие функциональные группы, которые могли взаимодействовать с атомом железа гема [137-139]. К подобным заместителям относятся CH_3SCH_2 , $CH_3SCH_2CH_2$, $HSCH_2$, $RSSCH_2$, SH , NH_2 , NH_2CH_2 . Кислород-, сера- и азот-содержащие ароматические структуры также были использованы для замещения по 19-му атому углерода [140], наилучшие из получившихся вариантов обладали константой ингибирования в области 1 нМ. Эпоксидные, эписульфидные и азиридиновые группы ингибируют активность ароматазы посредством взаимодействия гетероатома с атомом железа гема, но не смотря на свою реакционную способность не инактивируют саму молекулу фермента. Однако, стероидные соединения, у которых метильная группа у 19-го атома углерода заменена на сульфгидрильную или $HSCH_2$ -группу, более правомерно называть не просто

конкурентными, а необратимо действующими на механизм катализа ингибиторами [141].

Исследования, направленные на разработку ингибиторов цитохромов P450 печени также включают в себя дизайн и синтез инактиваторов фермента, действующих на механизм катализа ароматазы. Замена естественной гидроксильной метильной группы у 19-го атома углерода на пропиоловый или алленовый ($RR'C=C=CR''R'''$) остаток превращает стерол в необратимый ингибитор ароматазы [142, 143]; замена на диформетил также позволила добиться того, что молекула низкомолекулярного соединения смогла выступать в роли ингибитора, действующего на механизм катализа. При этом такие ингибиторы должны были быть активированы посредством гидроксирования по положению C-19 [144].

Соединение Org-30958 (19-этилдитио-андрост-4-ен-3,17-дион), 19-замещённый аналог андрост-4-ен-3,17-дион-стероидных ингибиторов было подвергнуто 1-й фазе клинических исследований в качестве компонента терапии эстроген-зависимого рака молочной железы [145]. В экспериментах *in vivo* на животных было показано, что замена на этилдитиогруппу приводит к 8-кратному увеличению ингибиторной активности соединения, даже по сравнению с 4-ОН-ацильной или SH-489-группами. Такой сильный эффект *in vivo* требует проведения внутриклеточного восстановления дисульфидных связей, с образованием 19-меркаптоаналога Org-30365, более выраженного ингибитора механизма катализа ароматазы плаценты, чем 4-ОН содержащее соединение SH489494 [139]. Клинически значимые ингибиторы механизма катализа ароматазы также получали введением замены по 4-му или 6-му атому углерода стеролового скелета, например, 4-ацетокси и 4-гидрокси-4-андростен-3,17-дион (4-ОН-ацил) – необратимый ингибитор ароматазы ткани плаценты, действующий через 19-метильную группу [146]. 4-ОН-ацильные соединения используются при лечении эстроген-зависимых онкологических заболеваний молочных желёз. Среди $\Delta 1,2$ -, $\Delta 4,5$ - и $\Delta 6,7$ -соединений, подвергнутых исследованиям в качестве

перспективных возможных ингибиторов ароматазы, на стадии доклинических испытаний 4-аминоандростан-1,4,6-дион (FC 24928) показал наиболее многообещающие результаты. Это соединение инактивировало ароматазу плацентарной ткани человека в той же степени, что и 4-ОН-ацильные ингибиторы, но, в отличие от них, имело менее выраженную андрогенную активность и не оказывало влияния на 5- α -редуктазу и цитохромы P450 [147].

Конъюгация 4-гидроксиандростеронового ядра, имеющая место например в 1,4,6-андростатриен-3,17-дионе, приводит к появлению у соединения ингибирующей активности по отношению к ароматазе и в клинике является показателем регрессии активности опухоли [148]. С другой стороны, введение C₁-метильного остатка в 1,4-андростандиен-3,17-дионовую структуру (пример – препарат «Атаместан») приводит к увеличению аффинности соединения к белку-мишени (K_i составляет порядка 2 нМ, в то время как у 4-ОН-ацильных ингибиторов около 29 нМ) – ароматазе ткани печени человека. Снижение скорости работы фермента под действием этих соединений приводит к снижению образования эстрогенных продуктов [149]. Это соединение вместе с его 1,2-метилен-замещённым аналогом было подвергнуто фазе I клинических испытаний как возможный агент терапии эстроген-зависимого варианта рака молочной железы. Дополнительные стероидные агенты, такие как 5-ен-7,17-дион и его 19-гидрокси-производные также были изучены как необратимые ингибиторы ароматазы [150].

Необратимое ингибирование фермента посредством химической модификации также достигается через введение 6-кето группы в стероидный скелет [151]. Мониторинг соотношения $H^3:C^{14}$ в исследованиях с дважды меченным по C-19 ингибитором показал, что C-19-метильный остаток, один из водород-несущих заместителей у C-19 атома и, что было показано в отдельном эксперименте, 1 β -атом водорода, продолжает оставаться в ковалентно-связанном виде [152]. В то же время обычная ароматизация остаётся возможной, поскольку 6-оксо-эстрон и 6-оксо-эстрадиол образуются одновременно. Также можно

упомянуть «Эксеместан», 6-метилен-андроста-1,4-диен-3,17-дион, ингибитор ароматазы с IC_{50} для ароматазы ткани плаценты человека сопоставимой с 4-ОН-ацилами. K_I для этих соединений составляет порядка 26 нМ для «Эксеместана» и 29 нМ для 4-ОН-ацилов [153]. Не смотря на более медленно развивающийся эффект, «Эксеместан» является более сильным ингибитором ароматазы, что было показано в экспериментах на животных [153], а также вызывает более быструю регрессию у химически-индуцированных опухолей молочных желёз у крыс, чем такие соединения как MDL18962 или SH-4895i [149]. Поскольку «Эксеместан» при оральном применении показал свою эффективность и сильный необратимый эффект ингибирования ароматазы, этот препарат был утверждён для клинического применения и поступил на рынок под коммерческим названием «Аромастатин» [154]. MDL18962, 10-(2-пропинил)эстр-4-ен-3,17-дион, является одним из наиболее сильных действующих на механизм катализа инактиваторов ароматазы, обладающим константой ингибирования порядка 3-4 нМ и временем полупревращения ферментативной реакции 9 и 6 минут для ароматазы ткани плаценты человека и павиана, соответственно [155]. Фаза I клинических испытаний и преклинические испытания показали, что MDL18962 эффективен для применения с целью снижения уровня эстрогенов [156].

Время-зависимая инактивация ароматазы 10-гидроперокси-4-эстрен-3,17-дионом, ещё одним действующим на механизм катализа ингибитором этого фермента, может быть остановлена NADPH или другим субстратом фермента, а также активность фермента может быть частично восстановлена дитиотреитолом, что было показано Covey и соавт. [157]. Также были описаны другие 10-замещённые аналоги субстрата, обладающие высокой аффинностью к белку-мишени, такие как 10-Р-меркаптоэстр-4-ен-3,17-дион, являющийся ингибитором, действующим на механизм катализа, и конкурентные ингибиторы ароматазы (19R)-10-оксипиранил и 10-тииранил-эстр-4-ен-3,17-дион [137, 140]. Стероиды, связанные по положению С-2, С-10 с гидроксипропаном, синтезирующиеся в виде стабильных углеродных аналогов 2β-гидроксилированного 19-оксо-

андростендиона, предполагаемого промежуточного продукта реакции, катализируемой ароматазой, были описаны как сильные конкурентные ингибиторы ароматазы ткани плаценты человека [158]. В противоположность этому, связанные с галогидрином субстратные аналоги оказались сильными ингибиторами ароматазы, действующими на механизм катализа [158].

Также, 4 β ,5 β -эпоксиандростендион, наряду с его 19-гидрокси и 19-оксо производными был исследован в качестве ингибитора ароматазы. Numazawa и соавт. было показано, что эпоксиды являются слабыми конкурентными ингибиторами, в то время как 19-гидрокси и 19-оксо производные показали большую эффективность [159].

3.6.3. Ингибиторы стерол-14 α -деметилазы (CYP51).

Деметилирование ланостерола по 14-му атому углерода является ключевым этапом биосинтеза холестерина. Селективное ингибирование цитохромов P450, которые катализируют эту реакцию различными замещёнными имидазолами, пиридинами, пиримидинами и другими липофильными гетероциклами является основным механизмом действия множества антигрибковых препаратов [160-162]. Противогрибковое действие, являющееся следствием ингибирования стерол-14 α -деметилазы, обусловлено, накоплением 14-метил-стеролов в мембранах чувствительных к препаратам грибов, приводящем к вредным для жизнедеятельности грибов изменениям в мембранной проницаемости [163-165].

Миконазол, флуконазол, кетоконазол и схожие с ними по структуре азолы ингибируют активность 14 α -деметилазы грибов в очень низких (нМ) концентрациях [166, 167]. Однако, изучение ферментов этого подсемейства, полученных от млекопитающих, показало, что для таких белков необходимо применять для достижения ингибирующего эффекта более высокие концентрации низкомолекулярного соединения, в различном диапазоне до 100 мкМ [168, 169]. Кетоконазол в низких концентрациях, при этом, является ингибитором не только C17-20-лиаз, но и CYP3A4 ткани печени человека, таким

образом клиническое применение этого препарата несколько ограничено [170]. Замещённые имидазолы и другие несущие азот гетероциклические соединения, обладающими противогрибковым эффектом, связываются с атомом железа гема цитохромов P450. Это взаимодействие характеризуется спектром поглощения II типа [171].

Сильные ингибиторы имидазольного ряда, содержащие изопреновую структуру, такие как AFK-108, содержат гераниловый остаток, специфично взаимодействующий с регионом боковой цепи активного центра молекулы CYP51, отвечающим за распознавание стероидного субстрата. К сожалению, как было показано Ito и соавт. эти соединения и их фамезиловые производные ингибируют не только изоформы белков тканей печени крыс, но и ферменты печени человека, принадлежащие к суперсемейству P450, участвующие в метаболизме лекарств, что ставит возможность клинического применения этих соединений под вопрос [172].

Проведение биоинформационных экспериментов, посвящённых анализу возможных структур ингибиторов, позволило создать 14 α -метил-15-аза-D-гомостеролы, соединения, в условиях *in vitro* показавшие высокую противогрибковую активность и фунгистатическое действие, наряду с удовлетворительными результатами в экспериментах на мышинной модели кандидоза [173]. Введение в молекулу функциональных групп изонитросоединений (=NOH) при 15 атоме углерода стеролового скелета, также приводит к приобретению молекулой ингибирующих свойств по отношению к CYP51, при этом геометрия таких соединений очень похожа на 15-азагомостеролы [174]. Также и 7-оксо-24, 25-дигидроланостеролы, разобщающие каталитический цикл CYP51, полностью блокируя передачу второго электрона на комплекс с окисленным атомом железа, оказались перспективны в качестве возможных ингибиторов CYP51 [175]. Более того, структурные аналоги 15,32- и 15,21-оксиланостерола были исследованы Trzaskos и соавт. на способность ингибировать механизм катализа CYP51. Среди этих аналогов, (32S)-

винилланост-8-ен-3 β ,32-диол оказался сильным время-зависимым инактиватором, в то время как (32R)-винилланост-8-ен-3 β ,32-диол показал единственный эффект в виде конкурентного ингибирования стерол-14 α -деметилазы [176]. Замещение водорода у 15-го атома углерода в типичном случае происходящая, например, при отщеплении фтора от 15 α -фторланост-7-ен-3 β -ола, соединения, окисляемого CYP51, приводит к образованию 14-альдегида, однако, дальнейшие превращения молекулы оказались невозможны в силу потери фтора [177]. Это соединение является т.н. «пролекарством», и для проявления его ингибирующей активности необходим процесс активации латентной формы метаболическими ферментами.

Структурные аналоги ланостерола с аминными и имидазольными функциональными группами, присоединённые по 14-му атому углерода, также привлекали интерес исследователей как возможные ингибиторы стерол-14 α -деметилазы. Стероиды с 14-(1-гидроксиэтил), 14-(1-оксоэтил) или 14-карбоксильной группой были описаны как конкурентные ингибиторы этого фермента [178-180]. Структурные аналоги ланостерола, у которых 14-метильная группа была замещена на винильную, этинильную, аллильную, пропаргильную, 1-гидроксипропаргильную, 1-кетопропаргильную, дифторметильную, эпоксидную или эписульфидную были исследованы различными авторами как потенциальные ингибиторы ферментов семейства CYP51, действующие на механизм катализа [181-183]. Хотя было показано, что этинил-стеролы являются только действующими на механизм катализа низкомолекулярными ингибиторами ферментов этого семейства [183], было обнаружено, что большинство изученных в рамках этих экспериментов соединений действовали как конкурентные ингибиторы (например, соединения, содержащие эпоксидную и эписульфидную группы). Эти соединения также можно рассматривать как прототипы возможных противолипидемических препаратов, благодаря их способности ингибировать один из ключевых ферментов биосинтеза холестерина [184].

Ингибирование стерол-14- α -деметилазной активности останавливает биосинтез стерола, что является летальным для одноклеточных организмов,

усиливает процессы роста и развития у растений, и снижает эндогенную продукцию холестерина у животных. В то время как ингибиторы CYP51 являются предметом исследований как потенциальные гербициды и лекарства, снижающие уровень холестерина в качестве побочного эффекта, в настоящее время они наиболее востребованы в качестве противогрибковых препаратов для лечения микозов человека и для профилактики заражения пищевых продуктов в сельском хозяйстве [23]. Спрос на ингибиторы CYP51 постоянно возрастает вследствие явления лекарственной резистентности, увеличения распространения оппортунистических заболеваний, вызываемых грибами, одновременно с увеличением количества пациентов с иммунодефицитом (ВИЧ-инфекция, пациенты, подвергшиеся процедуре противораковой химиотерапии, пациенты, прошедшие через трансплантацию органов или костного мозга) и пациентов, страдающих такими серьёзными заболеваниями, как туберкулёз и т.п. Любые новые знания, получаемые при исследовании ингибиторов CYP51, могут быть полезны в лечении смертельных заболеваний, вызываемых паразитами-трипаносомами (возбудители болезни Шагаса, американского трипаномоза).

Наиболее распространёнными в настоящий момент лекарственными препаратами среди ингибиторов CYP51, являются соединения класса азолов (имидазолы и триазолы). Азольный атом азота образует координационную связь с атомом железа гема, что ингибирует активность фермента, предотвращая связывание субстрата, и останавливая, таким образом, метаболизм. Азолы играют основную роль в лечении системных и дермальных микозов [185] и показали себя эффективными для лечения лейшманиоза и болезни Шагаса [186, 187]. Азолы менее токсичны чем другие антимикотики и противотрипаносомные лекарства, являются более доступными и дешёвыми препаратами, однако, имеют несколько побочных эффектов. Продолжительное применение азолов может привести к ингибированию других ферментов P450 [188] и вызвать резистентность путём формирования лекарственной толерантности. Наиболее распространёнными причинами, приводящими к формированию толерантности являются [189]:

1. мутации в генах грибковых CYP51 (описаны десятки мутаций, которые могут быть связаны с резистентностью к азолам [190, 191]),
2. увеличение экспрессии генов CYP51,
3. увеличение клиренса азолов или снижение их биодоступности.

В настоящее время проблема применения азолов в лечении паразитарных заболеваний находится под пристальным вниманием учёных, и данной тематике посвящены многочисленные современные работы [192].

Одним из путей для предотвращения развития резистентности к азолам может быть ингибирование CYP51 с помощью субстратных аналогов. В противоположность азольным производным стеролы имеют более высокое время жизни в водном растворе и обладают большей способностью проникать через мембрану. При применении аналогов субстратов CYP51 для блокировки биосинтеза холестерина у человека было выяснено, что, например, 7-окси-, 15-кето-, 15-оксим-, 15-гидрокси-, 26-оксо- производные ланостерола обладают ярко выраженным эффектом *in vivo* (являются конкурентными ингибиторами CYP51 и супрессорами 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим-А редуктазы) [177]. Также 14- α -аминопроизводные ланостерола показали себя эффективными в качестве ингибиторов гомологов CYP51 из *Candida albicans* и *Trypanosoma cruzi* [40, 193].

Богатым источником различных структурных аналогов естественных субстратов CYP51 могут оказаться растительные и животные стероидные и тритерпеновые соединения. Было показано, что введение ряда стероидных спиртов водорослей подопытным животным вызывало снижение уровня холестерина в крови [194], механизм возникновения подобного эффекта в настоящий момент остаётся неизвестным. Также было показано, что тритерпеновые гликозиды голотурий способны образовывать комплексы с холестерином [195], аналогичный эффект был показан для растительных гликозидов [196]. В многочисленных работах описан антимикотический эффект, оказываемый гликозидами, выделенными из морских и наземных организмов, в

том числе на такие патогенные грибы как *Candida albicans* и *Candida glabrata*, и другие физиологические эффекты этих соединений [194, 197, 198], возможно связанные с конкурентным ингибированием CYP51. Также различными авторами было показано, что при назначении обогащённой растительными стеролами диеты, у пациентов наблюдалось снижение уровня холестерина в крови [199, 200], что также можно связывать, помимо всего прочего, с возможным ингибированием CYP51.

Первым этапом в разработке новых лекарств *de novo* является скрининг многочисленных потенциальных лигандов для белка-мишени с последующим анализом параметров взаимодействия (например, термодинамических характеристик) этих веществ с целевым белком.

3.7. Термодинамические и кинетические параметры взаимодействия лигандов с белком-мишенью.

В настоящее время получено большое количество данных о термодинамических параметрах взаимодействия различных лигандов с многочисленными мишенями, многие из которых – клеточные мембранные или плазматические рецепторы [201]. Сведения о термодинамических параметрах этих взаимодействий важны для того, чтобы получить максимально возможный объём информации о взаимодействии лиганда и его мишени. Фактически, простое определение равновесных констант взаимодействия (константы диссоциации K_D или константы связывания K_A обратной K_D) позволяет вычислить изменение стандартной свободной энергии Гиббса (ΔG°) при этом взаимодействии при данной температуре:

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

Где T – температура, а R – универсальная газовая постоянная. А получив набор равновесных констант диссоциации при разных температурах, становится

возможным вычислить изменение стандартной энтропии (ΔS°) и стандартной энтальпии (ΔH°) в ходе этого взаимодействия [202]. Определение K_A и/или K_D является незаменимым методом для скрининговых исследований потенциальных лигандов как объектов исследования при разработке новых лекарственных препаратов, а также позволяет фармакологически охарактеризовать белки-мишени. В то же время, данные об изменении энтальпии и энтропии предоставляют возможность охарактеризовать два основных вида молекулярных событий, ответственных за субстратное распознавание и феномен взаимодействия: стандартная энтальпия может рассматриваться как количественный показатель изменений энергий межмолекулярных связей (водородных связей и взаимодействий Ван-дер-Ваальса), происходящих в процессе межмолекулярного взаимодействия, в то время как стандартная энтропия является хорошим показателем перестроек, происходящих в структуре растворителя (воды, буфера или иной среды, в которой происходит регистрация взаимодействия) в течение тех же самых процессов [203]. Полученные данные могут быть использованы для предсказания эффекта действия химического соединения на функционирование белка-мишени. В частности, было показано на примере большого количества разнообразных рецепторов (как мембранных, так и внутриклеточных), что агонисты и антагонисты этих рецепторов в ряде случаев могут различаться по термодинамическому характеру их взаимодействия с мишенью – взаимодействие может быть энтропийно-зависимым ($\Delta S^\circ \gg 0$, $\Delta H^\circ \geq 0$) или энтальпийно-зависимым ($\Delta H^\circ \ll 0$, $\Delta S^\circ \leq 0$ или > 0). Данное явление получило название «термодинамическая дискриминация» [204]. Интересным представляется исследовать возможности наличия данного явления не только у белков, играющих роль рецепторов, но и обычных физиологических белков, в частности, ферментов метаболических путей, например CYP51A1. Также в ходе исследований мембранных рецепторов было показано, что ΔC_p (изменение теплоёмкости системы при постоянном давлении) при их взаимодействии с лигандами практически равно 0. Данное явление является нетипичным для

взаимодействия макромолекул в растворе и в настоящий момент нуждается в дополнительном изучении [205]. Наконец, третьим эффектом, который описывается различными источниками, является т.н. «термодинамическая компенсация», когда энтальпийная и энтропийная компоненты хорошо коррелируют с уравнением линейной регрессии, в частном случае имеющем вид:

$$-T\Delta S^\circ \text{ (кДж/моль)} = (-1,01 \pm 0,01)\Delta H^\circ \text{ (кДж/моль)} - 42,4(\pm 0,5) \text{ (кДж/моль)} [63]$$

что является одной из форм общего уравнения

$$\Delta H = a \cdot \Delta S + b$$

Где a (компенсационная температура) имеет смысл тангенса угла наклона прямой экстраполяции в графике зависимости ΔH от ΔS , а b является коэффициентом, зависимым от энергии взаимодействия [206]. Однако, споры о природе и значимости данного явления не утихают и в настоящее время [203-206].

Одним из наиболее перспективных методов, позволяющих объединить скрининговые исследования с изучением параметров взаимодействия изучаемых объектов, является метод биосенсорного анализа с помощью оптического биосенсора, работающего на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance, SPR). Биосенсоры такого типа могут лежать в основе исследований, направленных на поиск новых ингибиторов различных белков, являясь отправной точкой для исследований, поскольку позволяют выбрать из широкого круга соединений-кандидатов те, которые наиболее целесообразно подвергнуть более трудоёмким исследованиям для подтверждения способности этих соединений ингибировать активность целевого белка-мишени.

3.8. Метод поверхностного плазмонного резонанса.

Поверхностный плазмонный резонанс - это квантовое оптико-электрическое явление, возникающее при взаимодействии света с поверхностью металла. При определенных условиях энергия световых фотонов передается группе электронов, называемых плазмонами, на поверхности металлов. Передача энергии происходит

только на специфической, резонансной длине волны света. То есть длине волны, где квант энергии, переносимый фотоном, точно равен уровню квантовой энергии плазмонов.

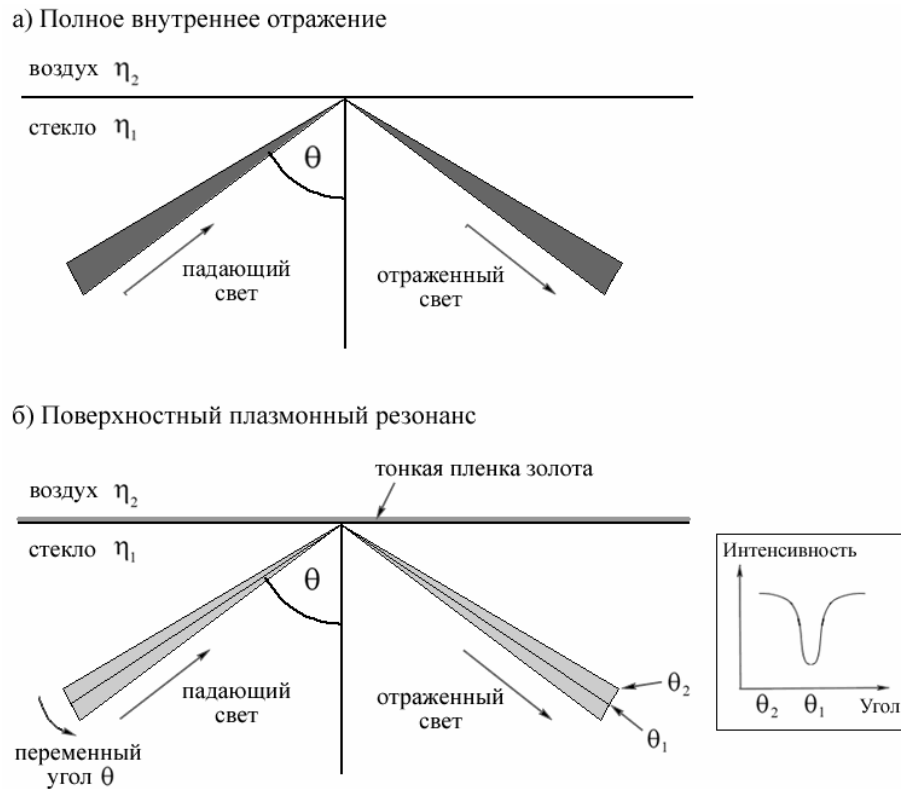


Рис. 4. Принцип полного внутреннего отражения и возникновение поверхностного плазмонного резонанса.

Поверхностный плазмонный резонанс основан на одном из основных принципов оптики – принципе полного внутреннего отражения (рис. 4а). На границе раздела двух фаз с различными коэффициентами преломления, η_1 и η_2 , полное отражение происходит при значениях угла падения больше критического угла θ , когда $\eta_1 > \eta_2$. Одновременно с этим от границы раздела фаз в фазу 2 распространяется затухающая электромагнитная волна.

Поверхностный плазмонный резонанс возникает, когда на поверхности раздела фаз между двумя оптическими средами помещена тонкая проводящая пленка. При особом угле падения, большем, чем угол полного внутреннего отражения, поверхностные плазмоны в проводящей пленке (осциллирующие на

поверхности металла электроны) входят в резонанс со светом из-за совпадения частот. Так как при этом резонансе поглощается энергия, то интенсивность отраженного света показывает спад при угле, на котором возникает SPR (рис. 4б).

Резонансную длину волны можно определить с большой точностью измерением интенсивности света, отраженного металлической поверхностью. На большинстве длин волн металл работает как зеркало, отражая практически весь падающий свет. На удовлетворяющей резонансным условиям длине волны падающий свет почти полностью поглощается, соответственно, длина волны, на которой происходит максимальное поглощение света, и есть резонансная длина волны.

Взаимодействие света с поверхностью металла приводит к возникновению плазмона, группы возбужденных электронов, которые проявляют себя как единый электрический объект. Плазмон, в свою очередь, генерирует электрическое поле, которое распространяется приблизительно на 100 нанометров над металлической поверхностью. Особенность этого явления, которая делает SPR аналитическим инструментом, такова, что любое изменение химического состава среды в области действия поля плазмона, приводя к изменению коэффициента преломления среды, вызывает изменение резонансной длины волны света. Т.е., химическое изменение выражается в сдвиге длины волны света, который в большей степени поглощается, чем отражается, и величина сдвига количественно связана с величиной химического изменения. Резонансная длина волны SPR определяется тремя факторами: металлом, структурой поверхности металла и природой среды, контактирующей с поверхностью металла.

Явление SPR не является специфичным. Оно не может делать различия между разными химическими изменениями. Хотя это может казаться ограничением, на самом деле это является огромным преимуществом. Специфичность зависит от выбора пары молекул, которые реагируют только друг с другом. Из этой пары одна молекула является детектором, а другая –

анализируемым объектом. Любая пара молекул, которая обладает специфической связью, может быть использована для SPR измерений. Такими парами могут быть антиген и антитело, комплементарно сопряженные нити ДНК, фермент и его субстрат или комплексообразователь и ион металла.

SPR можно использовать как основу для сенсора, обладающего способностью качественного и количественного определения широкого спектра химических и биологических объектов. Для анализа взаимодействия между двумя объектами на первой стадии происходит иммобилизация одного из объектов на поверхность чипа, далее через канал сенсора прокачивают раствор со вторым объектом. При этом взаимодействие регистрируется по изменению резонансного угла.

Метод SPR обладает рядом важных практических преимуществ по сравнению с существующими аналитическими методами. Например, при использовании флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС), необходимо образовать комплексы исследуемого вещества с флуорофором, а при использовании изотермической калориметрии титрования, также как и в ФКС невозможно провести с одной пробой макромолекулы анализ взаимодействия с другим соединением, поскольку измерения проводятся в растворе путём однократного добавления различных концентраций лиганда, а не в проточной системе, позволяющей удалить весь анализируемый образец лиганда. Также при использовании этих методов наблюдается значительный расход материалов по сравнению с приборами, работающими на технологии SPR. Ещё одним важным преимуществом SPR является регистрация в реальном времени, путём возможности записи сенсограммы взаимодействия, в то время как другие методики позволяют получить набор данных в виде дискретных измерений. При использовании SPR время от нанесения пробы до получения результата зависит от конкретного объекта, но может занимать до 5 минут. В большинстве случаев нет необходимости в предварительной подготовке образца для его использования в

качестве сенсора. Единый сенсорный формат (размер, протокол хранения и использования, показания и т.д.) может использоваться для самых разных химических анализов, включая иммунологические, связывание нуклеиновых кислот, энзиматические, химические и сорбцию газов. Некоторые потенциальные области применения включают медицинскую диагностику, мониторинг окружающей среды, мониторинг сельскохозяйственных пестицидов и антибиотиков, анализ пищевых добавок, контроль за биологическими и химическими агентами военного и промышленного происхождения, а также мониторинг процессов химического и биологического производства в реальном времени [207-210].

3.9. Метод спектрального титрования.

Спектральное или спектрофотометрическое титрование – простой и в то же время надёжный способ непосредственной протекания физико-химической реакции, основанный на измерении спектров экспериментальных образцов. По типам спектров выделяют эмиссионную и адсорбционную спектроскопии, предметом изучения которых являются спектры испускания или поглощения, соответственно. В зависимости от изучаемых в ходе эксперимента длин волн выделяют радио, микроволновую, субмиллиметровую, инфракрасную, оптическую (включающую ближнюю ИК, видимую и частично УФ-области спектра и выделенную главным образом по прозрачности оптических материалов – стекла, кварца и др., из которых изготавливают кюветы для экспериментальных образцов), ультрафиолетовую, рентгеновскую спектроскопию. По характеру взаимодействия излучения с веществом спектроскопию подразделяют на линейную (обычную) и нелинейную, которая возникла благодаря применению лазеров для возбуждения спектров. Применение перестраиваемых лазеров на растворах красителей и полупроводниковых диодных лазеров, а также использование электронных цифровых методов регистрации спектров позволили достичь очень высокого спектрального разрешения и высокой точности

спектральных измерений. В биохимии белков, в частности цитохромов Р450, большое практическое применение нашла адсорбционная спектроскопия. Этот метод является надёжным инструментом определения состояния атома железа гема, входящего в простетическую часть белковой молекулы, поскольку разные спиновые состояния атома, характеризуются постоянными и воспроизводимыми пиками в спектре поглощения раствора этих белков. Эти пики, называемые также пиками Сорета, имеют следующие характеристики [49, 61-64]:

- 1) Максимум поглощения раствора цитохрома наблюдается при длине волны света около 450 нм для нативной белковой молекулы, не связанной с субстратом, когда атом железа в активном центре фермента находится в восстановленном состоянии;
- 2) Максимум поглощения наблюдается в области длины волны света 420 нм – это т.н. «низкоспиновое состояние», если атом железа гема подвергся окислению (например, связался с оксидом углерода), молекула белка также может быть подвержена деградации;
- 3) Минимумом поглощения при длине волны около 420 нм и максимумом в области 390 нм характеризуется связывание в активном центре субстратов и их структурных аналогов, – т.н. «высокоспиновое состояние» или спектральный ответ типа 1 (рис. 5);
- 4) Минимумом поглощения в области 390-400 нм и максимумом в области 420-425 нм характеризуется прочное связывание в активном центре лигандов, образующих 6-координированные комплексы с атомом железа – спектральный ответ типа 2. Как было отмечено выше, такой тип ответа наблюдается для многих широко применяемых в клинике лекарственных препаратов, например, класса азолов (рис. 6).

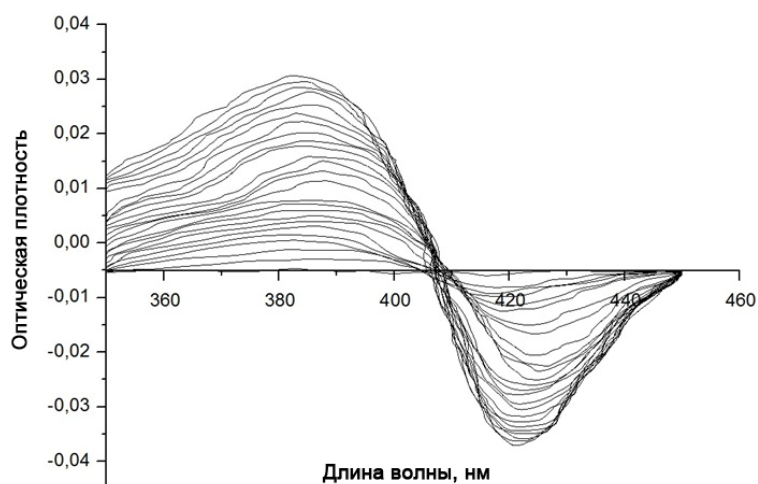


Рис. 5. Пример спектра поглощения раствора CYP51 человека при добавлении к нему возрастающих концентраций ланостерола и его структурных аналогов.

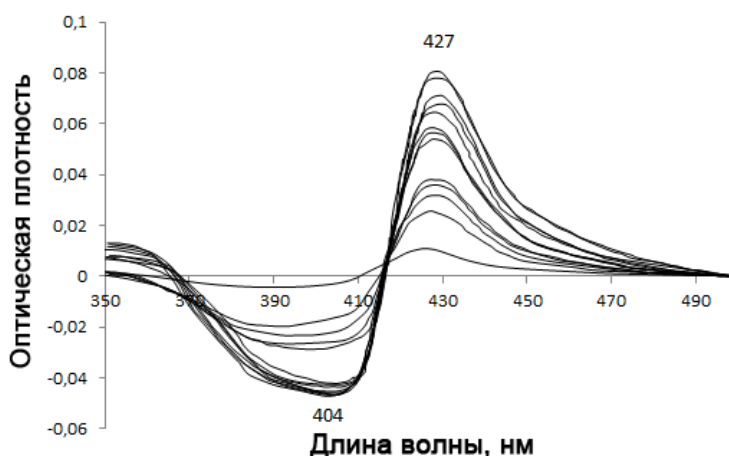


Рис. 6. Пример спектра поглощения раствора CYP51 человека при добавлении к нему возрастающих концентраций кетоконазола и его структурных аналогов.

3.10. Метод измерения активности CYP51A1 в восстановленной системе цитохрома.

Определение влияния различных соединений на активность цитохромов P450 – достаточно сложная и трудновыполнимая задача. В настоящий момент этот параметр оценивают по накоплению продукта реакции в восстановленной системе цитохромов, содержащих белки-партнёры, обеспечивающие каталитический цикл, необходимые химические реагенты и известную концентрацию субстрата. Через

определённые промежутки времени, из экспериментальной пробы забираются аликвоты, в которых проводят измерение содержания исходного субстрата и продукта реакции. В частности, подобная система для CYP51A1 была предложена Trosken и соавт. в 2004 году [211]. Ланостерол и 4,4-диметил-5-холеста-8,14,24-триен-3-ол (FF-MAS), являющийся продуктом ферментативной реакции CYP51A1 разделяют обратно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), после чего содержание продукта реакции и исходного субстрата определяют масс-спектрометрическими методами с применением химической ионизации при атмосферном давлении или фотоионизации при атмосферном давлении, что обусловлено липофильной природой этих соединений (рис. 7), и тройного квадруполя. Далее, сравнивая содержание продукта и субстрата в начальный момент и по истечении определённого промежутка времени в контрольном и экспериментальном образце, можно получить сведения о влиянии различных химических агентов или условий протекания ферментативной реакции на активность цитохромов (рис. 8).

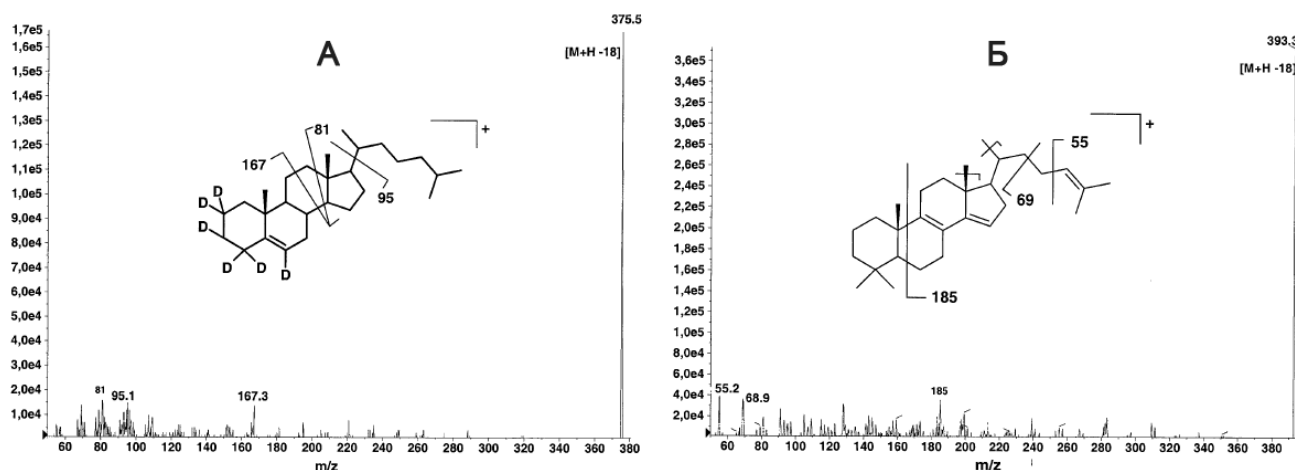


Рис 7. Продукты ионизации ланостерола (А) и FF-MAS (Б) и их масс-спектры (по Trosken и соавт. [211] с изм.)

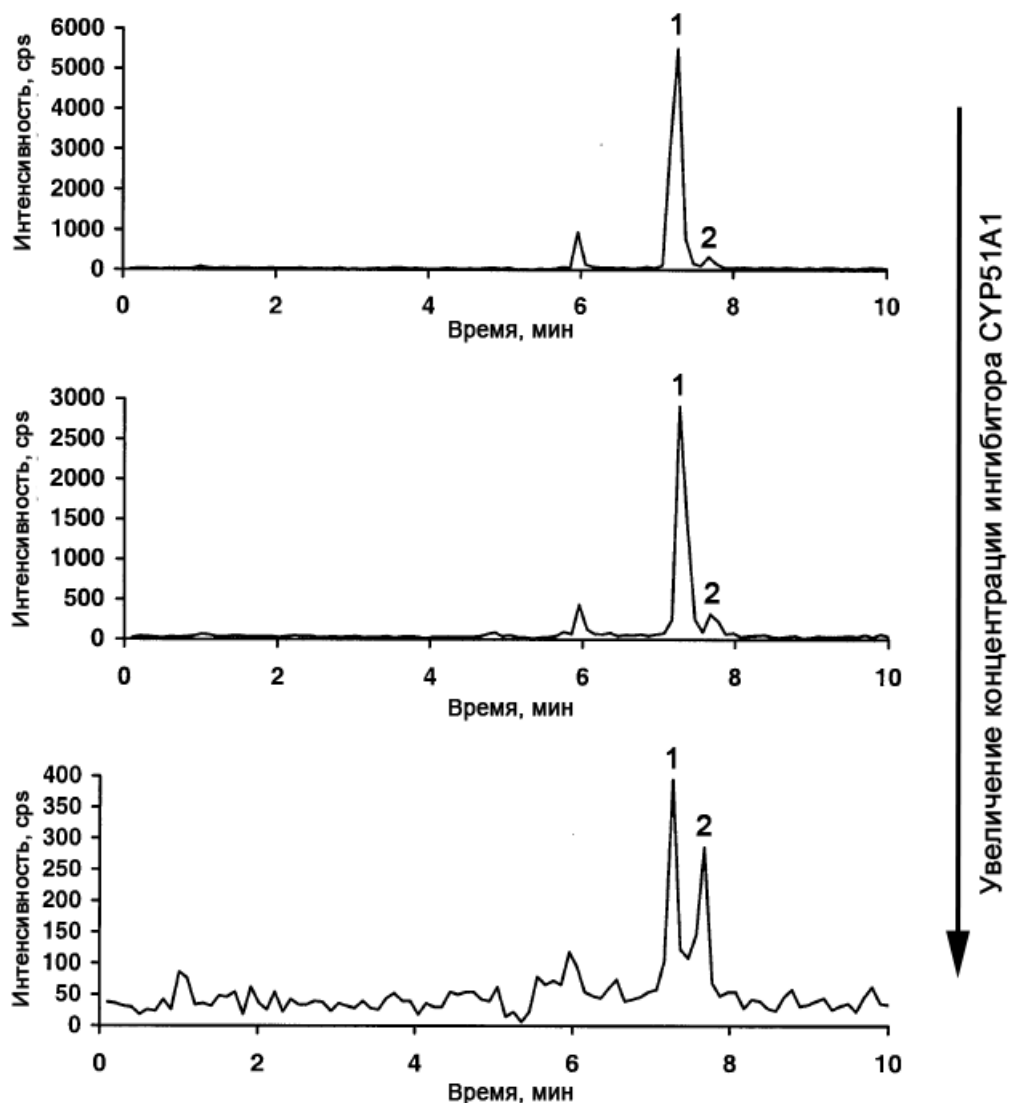


Рис. 8. Масс-хроматограммы разделения и детекции FF-MAS (1) и ланостерола (2) с помощью комбинации методов ВЭЖХ и масс-спектрометрии при различных концентрациях ингибирующего активность CYP51A1 соединения (по Trosken и соавт. [211] с изм.)

3.11. Электрохимический метод поиска потенциальных ингибиторов цитохромов.

Метод биохимического тестирования в восстановленной системе цитохрома хотя и является надёжным и универсальным инструментом, достаточно сложен в реализации, поскольку требует наличия белков-партнёров цитохромов, источников электронов и их переносчиков, а также соответствующих условий

реакции. Кроме того, регистрация ингибирующего действия на активность белка или его отсутствие производится посредством хромато-масс анализа.

Ещё одним методом, позволяющим оценить ингибирующее действие различных соединений, является электрохимический анализ. В основу метода положена адсорбция белка на поверхности электрода, который выступает в роли источника электронов. Это позволяет с одной стороны упростить процедуру, поскольку отпадает необходимость присутствия в реакционной смеси партнёров исследуемого белка, а с другой позволяет непосредственно наблюдать эффект действия исследуемых соединений. Выделяют прямой и непрямой способ передачи электронов от электрода на белок, что связано с присутствием или отсутствием различных электрон-переносящих посредников в конструкции электрода.

Согласно литературным данным, наибольшей эффективности можно добиться применяя электроды с прямой передачей электронов [212], однако такой подход сопряжён с рядом технических проблем, встающих перед исследователем:

1. Значительным погружением электрореактивных простетических групп белковой структуры вглубь молекулы белка и связанной с этим зависимостью передачи электронов от ориентации белка на поверхности электрода;
2. Невыгодной для электрохимических процессов ориентации белка на поверхности электродов (считается нормой, если электроактивными остаётся около 4% иммобилизованных на электроде молекул цитохрома [213];
3. Денатурацией белка в ходе адсорбции на поверхности электрода и формированием изолирующего белкового слоя, препятствующего электронному обмену с электродом.

Основной вопрос, предъявляемый к электрохимическим методикам – это сохранение нативной структуры белковой молекулы в ходе адсорбции на поверхности электродов. Reira и соавт. было показано, что при непрямой передаче

электронов, не было показано спектроэлектрохимическими методами взаимодействия CYP101 с CO [214]. В то же время, Bistolas и соавт. показали, что в экспериментах с прямой передачей электронов, спектры взаимодействия CYP101 с CO присутствуют [215].

В настоящее время известно большое количество различных подходов по созданию тест-систем на основе электрохимических методов [212, 216]. Среди интересных работ можно выделить эксперименты по оценке влияния различных ингибиторов и субстратов на изменение вольт-амперных характеристик в ходе акта катализа, проведённые Шумянцевой и соавт. [18, 213, 217, 218] и Гиндилис и соавт. [219]. В частности, было показано, что при исследовании циклических вольтамперограмм можно достоверно разделить соединения, являющиеся субстратами или ингибиторами некоторых белков, включая CYP51 *Mycobacterium tuberculosis* [18, 218] и холинэстеразы [219]. Кроме этого, данная методика позволяет оценить степень ингибирования и рассчитать IC_{50} и K_I . Ещё одним плюсом электрохимического анализа можно считать низкую стоимость изготовления электродов методом трафаретной печати.

4. Материалы и методы.

4.1. Химические реактивы.

В работе использовались следующие реактивы: дитиотреитол (DTT) (GibcoBRL, США), 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат (CHAPS) (Sigma, США), диметилсульфоксид (ДМСО) (Sigma, США), концентрат HBS-N буфера (1500 NaCl, 100 mM HEPES, pH 7.4 при 10-ти кратном разведении) (GE Healthcare, США), biadesorb solution-1 (0,5 % додецилсульфат натрия) (GE Healthcare, США), biadesorb solution-2 (50 mM глициновый буфер, pH 9,0) (GE Healthcare, США), этанол 99,5% (Wako, Япония), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-HCl (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS) (GE Healthcare, США), 10 mM ацетат натрия (pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5) (GE Healthcare, США), 1 M раствор этаноламин-HCl (pH 8,5) (GE Healthcare, США), NaCl (Реахим, Россия), HEPES (Sigma, США), дихлорметан (Sigma, США), прогестерон (Sigma, США), (MgCl₂ (Реахим, Россия), тринатриевая соль изолимонной кислоты (Sigma, США), ацетонитрил (Реахим, Россия), дилаурофосфатидилхолин (Cayman Pharma, Чехия), метил-β-циклодекстрин (Cayman Pharma, Чехия), НАДФ·Н (Sigma, США). В биосенсорных экспериментах использовались стандартные оптические чипы CM5 (GE Healthcare, США). В биохимических экспериментах по определению влияния низкомолекулярных соединений на активность CYP51 использовались рекомбинантные белки: НАДФ·Н-редуктаза цитохромов P450 (CPR) и изоцитрат дегидрогеназа – полученные сотрудниками института биоорганической химии НАН Беларуси под руководством Гилепа А.А.

4.2. Белки.

Для работы были использованы высокоочищенные (не менее 95% чистоты по ДСН-электрофорезу в 12% ПААГ) рекомбинантный CYP51 человека (дикий тип) и *Candida albicans* (резистентный к азолам штамм, содержащий мутации K-179-E, L-224-I, G-307-C, M-372-T, выявленные ранее у азол-резистентных штаммов

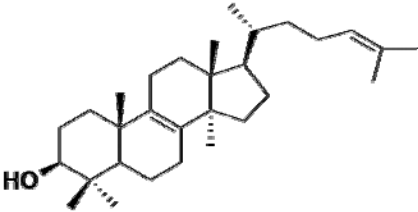
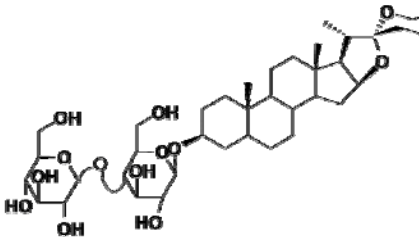
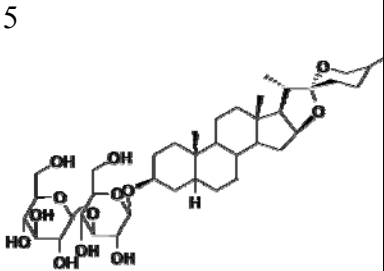
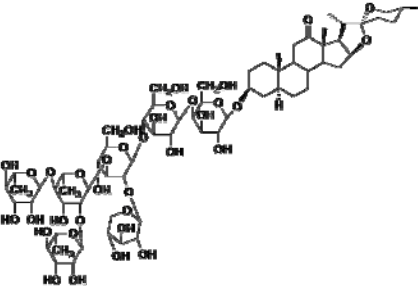
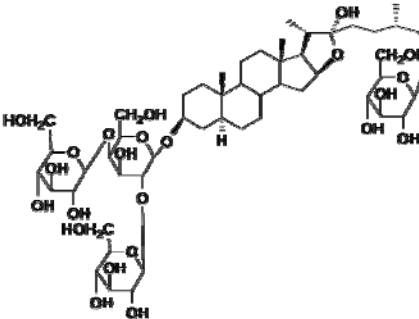
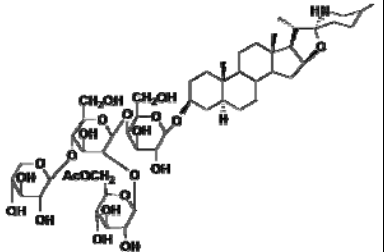
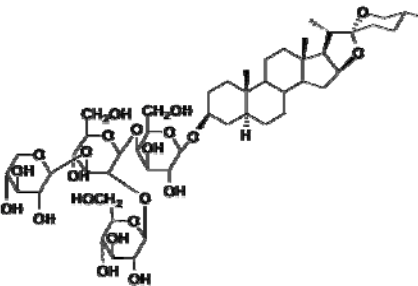
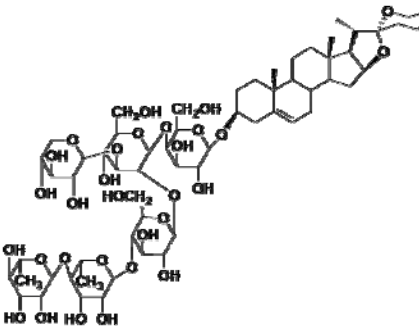
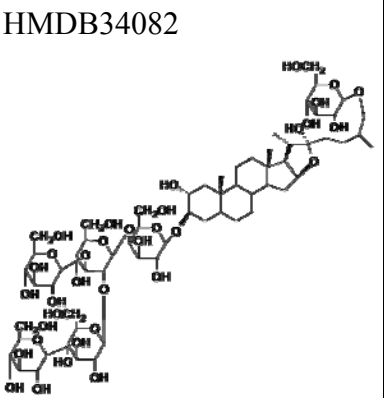
Candida albicans, полученных от нескольких клиник республики Беларусь). Белки, экспрессированные по ранее описанной методике [19], были любезно предоставлены к.х.н. Гилепом А.А. (Институт биоорганической химии НАН Беларуси).

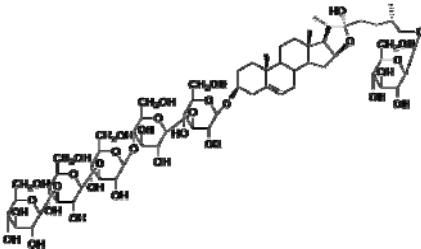
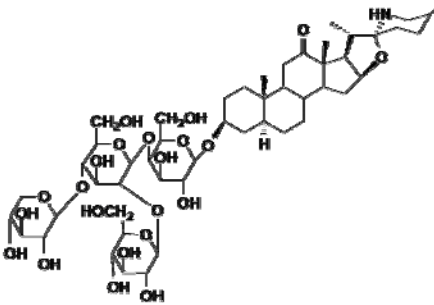
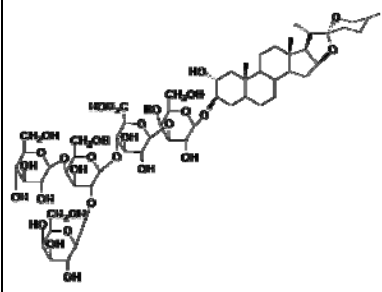
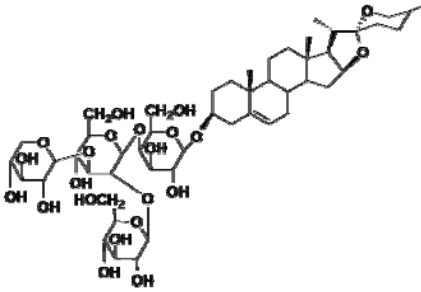
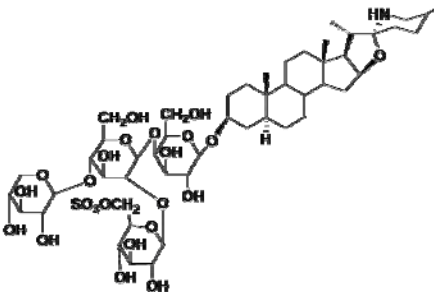
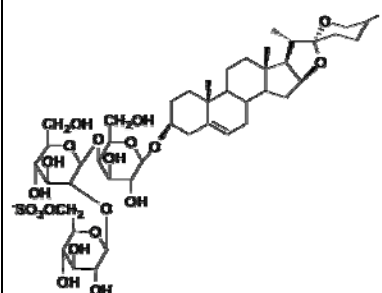
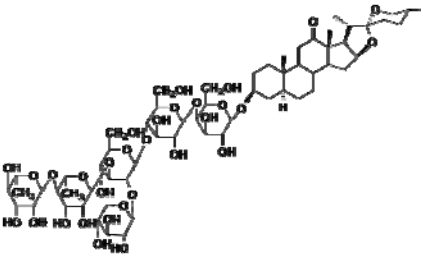
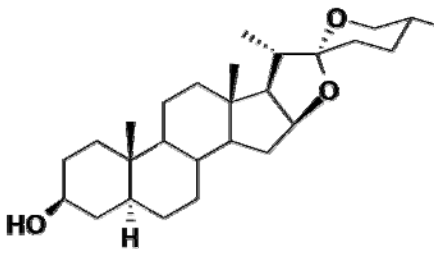
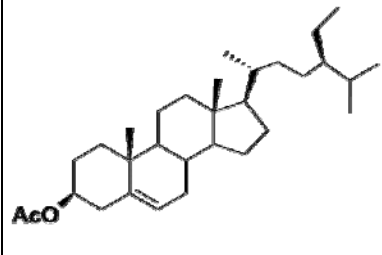
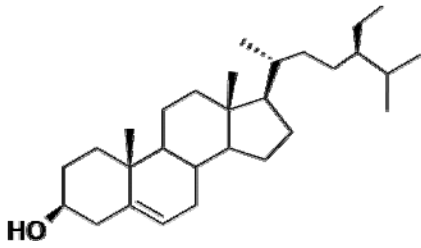
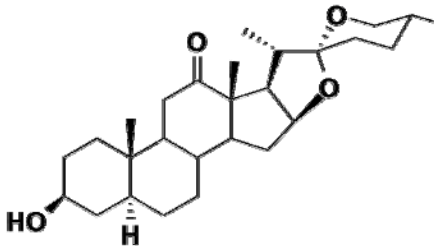
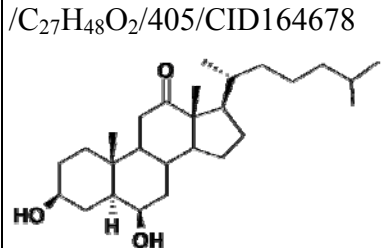
4.3. Низкомолекулярные соединения.

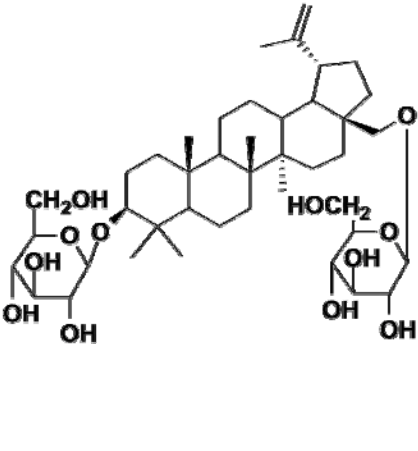
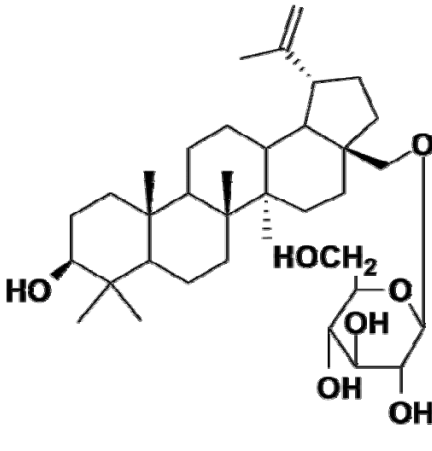
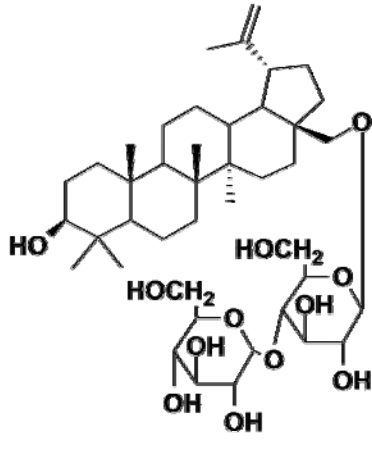
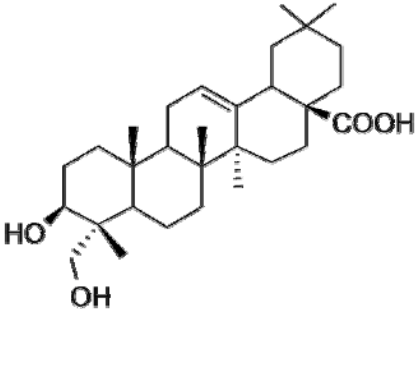
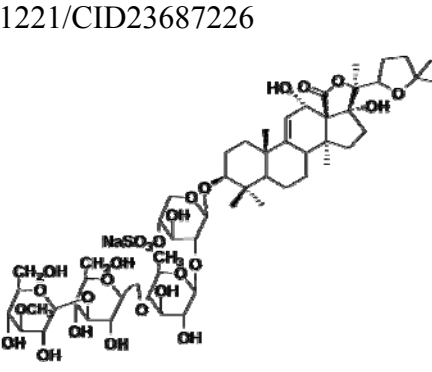
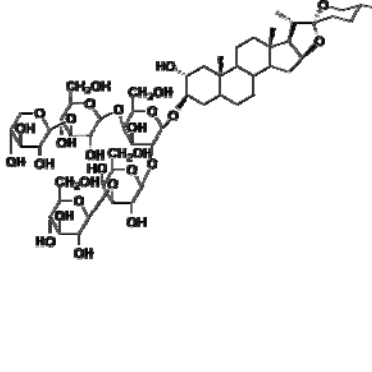
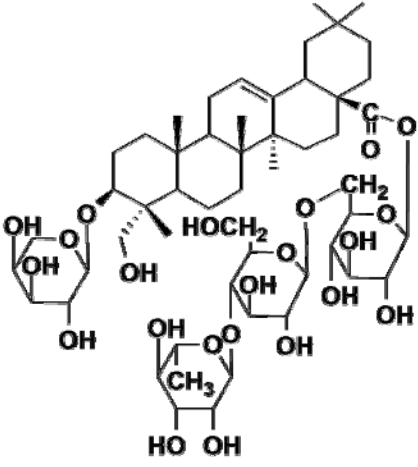
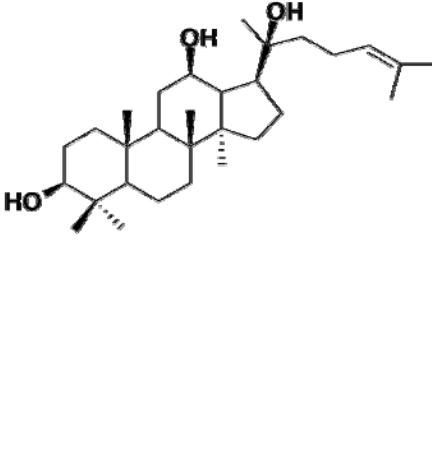
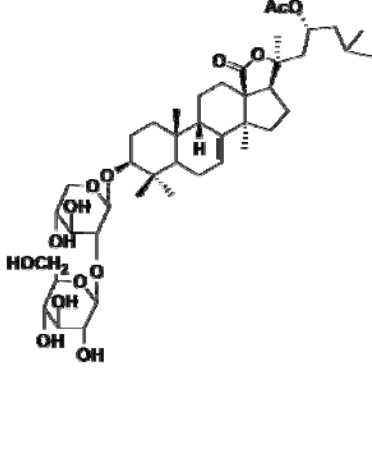
В работе были использованы различные низкомолекулярные соединения из класса азолов, стероидов и тритерпенов растительного и животного происхождения (таб. 1). Ланостерол (№1) и азолы (№№ 51-58) были получены от фирмы «Sigma» (США). Соединения №№ 2-20 были любезно предоставлены профессором Kintya P. (The 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), – по методикам, описанным ранее [220-225], были любезно предоставлены академиком Стоником В.А., д.б.н. Кича А.А. и к.х.н. Иванчиной Н. В. (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук).

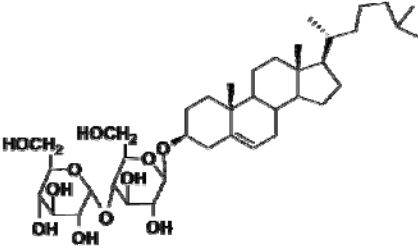
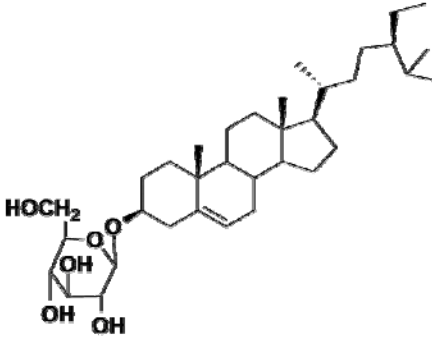
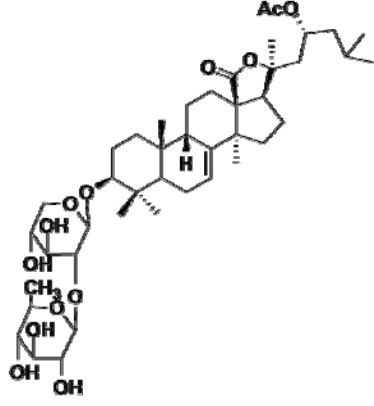
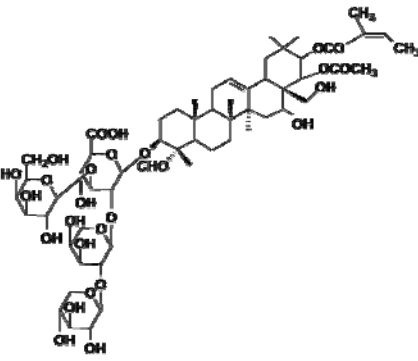
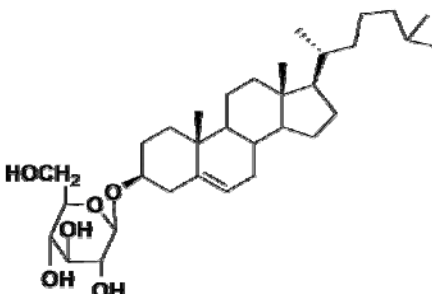
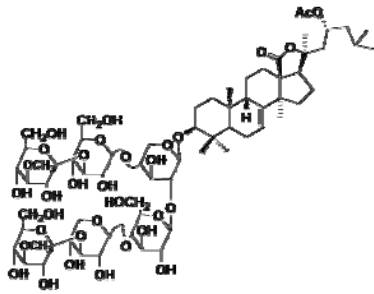
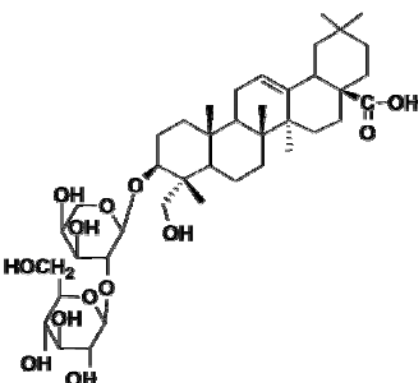
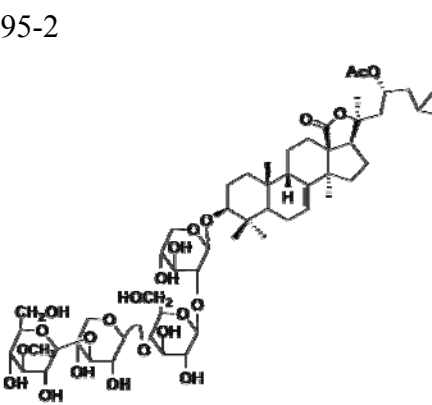
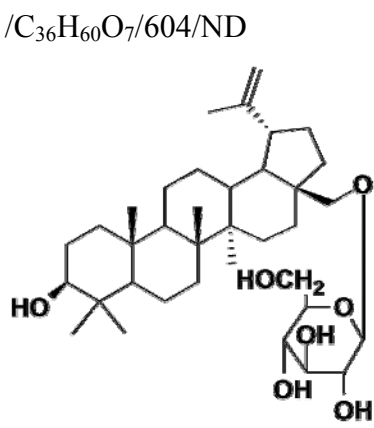
Таб. 1. Соединения, использованные в работе.CID – PubChem ID (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)HMDB – The Human Metabolome Database ID (<http://www.hmdb.ca/>)

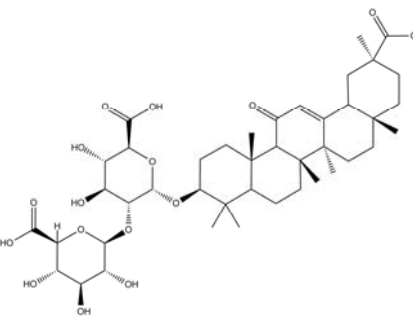
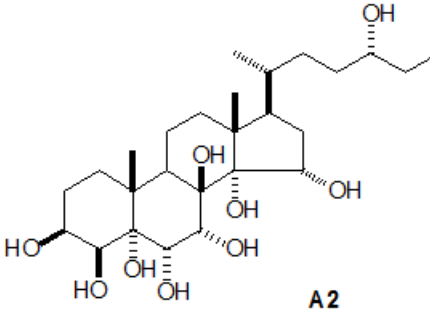
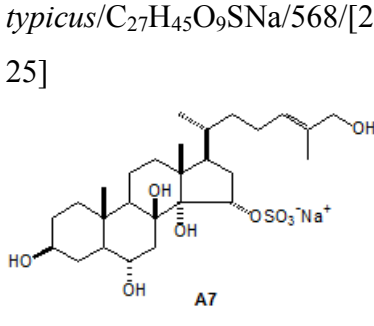
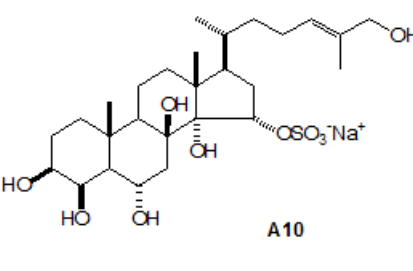
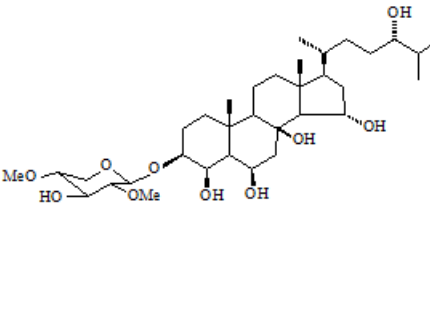
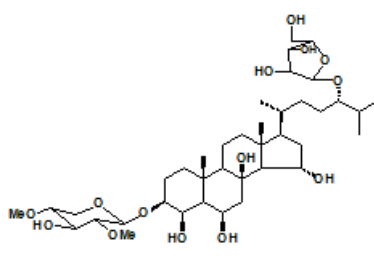
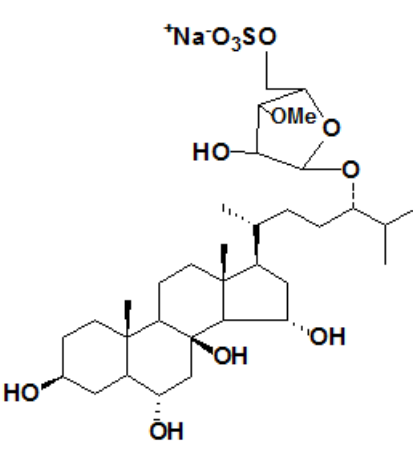
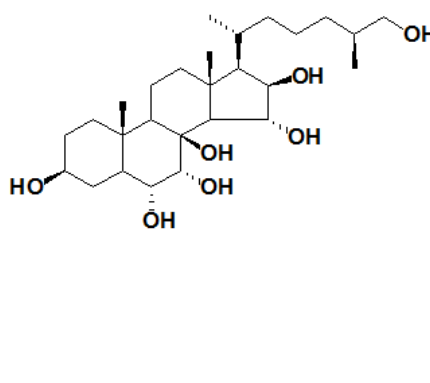
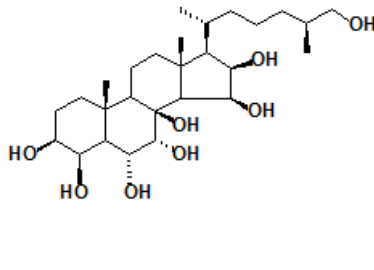
ND – нет данных

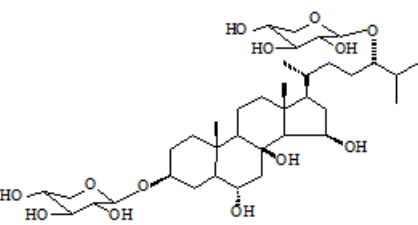
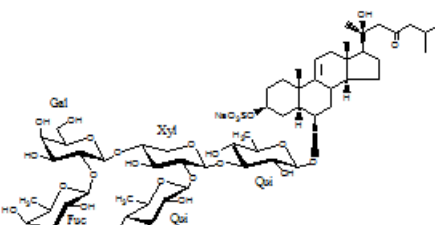
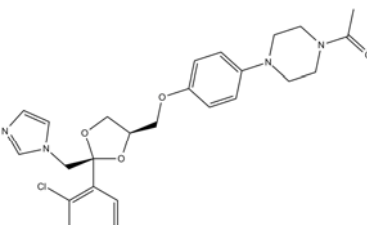
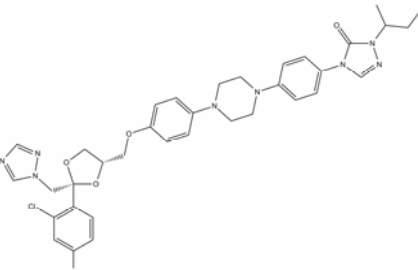
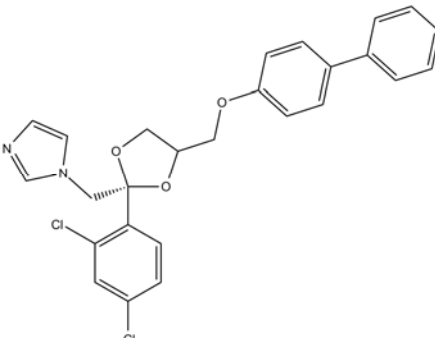
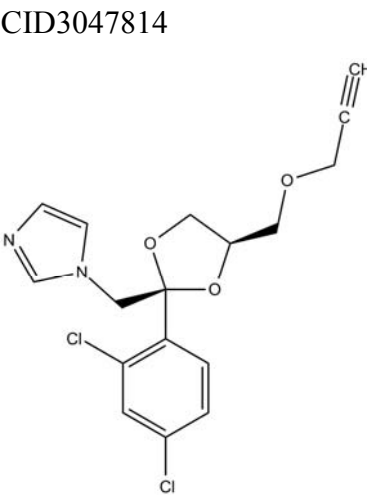
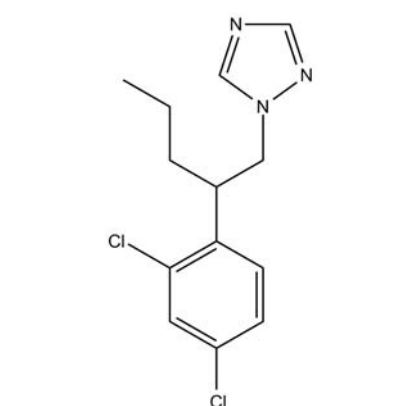
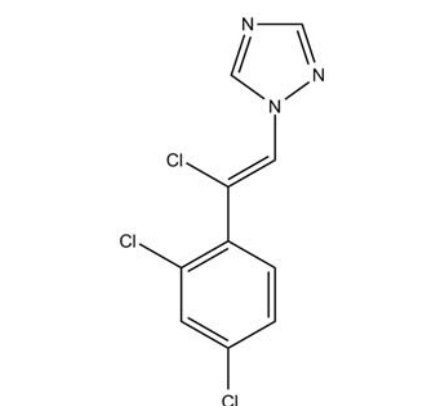
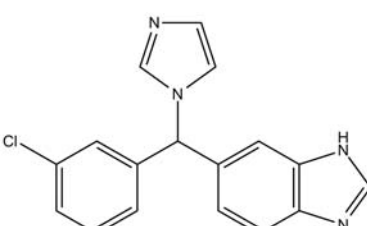
№ соединения название/брутто-формула/мол. вес, Da/ссылка		
№1 Ланостерол /C ₃₀ H ₅₀ O/427/CID246983 	№2 Неотигогенина биозид /C ₃₉ H ₆₁ O ₁₁ /705/[226] 	№3 Аспарагозид С /C ₃₉ H ₆₄ O ₁₃ /741/HMDB3183 
№4 Агавозид F /C ₆₈ H ₁₁₀ O ₃₅ /1488/HMDB32940 	№5 Томатозид А /C ₅₁ H ₈₆ O ₂₄ /1083/HMDB34083 	№6 Ацетат томонина /C ₄₇ H ₇₆ O ₁₉ /944/ND 
№7 F-гитонин /C ₅₀ H ₈₂ O ₂₃ /1051/CID44559009 	№8 Функиозид Н /C ₆₂ H ₁₀₀ O ₃₀ /325/CID401296 	№9 Капсикозид А /C ₆₃ H ₁₀₆ O ₃₅ /1423/ HMDB34082 

№10 Протополлигонатозид G /C₆₃H₁₀₄O₃₄/1405/CID3085249 	№11 Томатонин /C₄₅H₇₄O₁₈/903/HMDB33849 	№12 Капсикозин C₅₇H₉₄O₂₉/1243/ HMDB31354 
№13 Функциозид F /C₅₀H₈₀O₂₂/1033/CID3042757 	№14 Сульфированный томатонин/C₅₀H₈₂NO₂₄S/967/ND 	№15 Агавасапонин С /C₄₅H₇₂O₁₉/917/HMDB3335 3 
№16 Агавасапонин Е /C₆₂H₁₀₀O₃₁/1341/HMDB33807 	№17 Тигогенин /C₂₇H₄₄O₃/417/CID99516 	№18 Ацетат β-ситостерина /C₃₁H₅₂O₂/457/HMDB30151 
№19 β-ситостерин /C₂₉H₅₀O/415/HMDB00852 	№20 Гекогенин /C₂₇H₄₂O₄/431/[198] 	№21 5α-холестан-3β,6β-диол /C₂₇H₄₈O₂/405/CID164678 

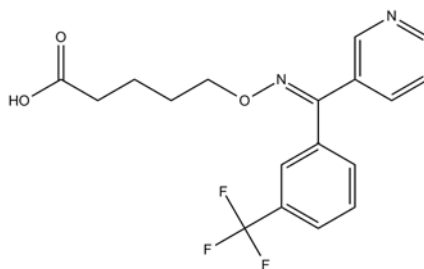
№22 Бисглюкозид бетулина /C₄₂H₇₀O₁₂/766/[227] 	№23 Глюкозид бетулина /C₃₆H₆₀O₇/604/[227] 	№24 Мальтозид бетулина /C₄₂H₇₀O₁₂/766/[227] 
№25 Хедерагенин /C₃₀H₄₈O₄/473/CID73299 	№26 Голотурин A/C₅₄H₈₅NaO₂₇S/ 1221/CID23687226 	№27 Дигитонин /C₅₆H₉₂O₂₉/1229/CID25444 
№28 Каулозид D /C₅₃H₈₆O₂₂/1075/CID71586956 	№29 Бетулафолиентриол /C₃₀H₅₂O₃/461/CID3080633 	№30 Стихопозид В /C₄₃H₆₈O₁₄/809/[227] 

№31 Мальтозид холестерина /C₃₉H₆₆O₁₁/710/[227] 	№32 Глюкозид β-ситостерола /C₃₅H₆₀O₆/576/[227] 	№33 Стихопозид А /C₄₃H₆₈O₁₃/792/CID119095 
№34 Теасапонин /C₅₉H₉₂O₂₇/1233/CID11953922 	№35 Глюкозид холестерина /C₃₃H₅₆O₆/549/[227] 	№36 Стихопозид С /C₆₈H₁₁₀O₃₂/1439/[227] 
№37 Каулозид С /C₄₁H₆₆O₁₃/767/CID13878151 	№38 Теленотозид В /C₅₅H₈₈O₂₃/1117/CAS №72175-95-2 	№39 28-O-β-D- глюкопиранозид бетулина /C₃₆H₆₀O₇/604/ND 

№40 Глицирризиновая кислота/$C_{42}H_{62}O_{16}$/823/ CID14982 	№41 AT-2. Нонаол A2 из <i>Archaster typicus</i>/$C_{26}H_{46}O_9$/502/[225]  A2	№42 AT-7. Сульфатированный гексаол A7 из <i>Archaster typicus</i>/$C_{27}H_{45}O_9SNa$/568/[225]  A7
№43 AT-10. Сульфатированный гептаол A10 из <i>Archaster typicus</i>/$C_{27}H_{45}O_{10}SNa$/584/[225]  A10	№44 HD-1. Хенрициозид H₁ из <i>Henricia derjugini</i>/$C_{34}H_{60}O_{10}$/628/[222] 	№45 HD-2. Левискулозид G из <i>Henricia derjugini</i>/$C_{39}H_{68}O_{14}$/760/[223] 
№46 PP1. Астеросапонин P₁ из <i>Patiria pectinifera</i>/$C_{33}H_{57}O_{12}SNa$/700/[220] 	№47 PP3. (25S)-5a-холестан-3b,6a,7a,8,15a,16b,26-гептаол, из <i>Patiria (Asterina) pectinifera</i>/$C_{27}H_{48}O_7$/484/[221] 	№48 PP4. (25S)-5a-холестан-3b,4b,6a,7a,8,15b,16b,26-октаол из <i>Patiria (Asterina) pectinifera</i>/$C_{27}H_{48}O_8$/500/[221] 

№49 D1. Дистоластериозид D1 из <i>Distolasteriasnipon</i> /C₃₇H₆₄O₁₃/716/[224] 	№50 ТА. Торнастерозид А из <i>Archaster typicus</i> /C₅₆H₉₁O₂₈SNa/1266/[228] 	№51 Кетоконазол/ C₂₆H₂₈Cl₂N₄O₄/531/ CID47576 
№52 Итраконазол /C₃₅H₃₈Cl₂N₈O₄/706/CID55283 	№53 Доконазол /C₂₆H₂₂Cl₂N₂O₃/481/CID65488 	№54 Парконазол C₁₇H₁₆Cl₂N₂O₃/367/ CID3047814 
№55 Пенконазол /C₁₃H₁₅Cl₂N₃/284/CID91693 	№56 Лореклезол /C₁₀H₆Cl₃N₃/275/CID3034012 	№57 Лиарозол /C₁₇H₁₃ClN₄/309/CID60652 

№58 Ридогрел/C₁₈H₁₇F₃N₂O₃/366/CID5362391



4.4. 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.

4.4.1. Подготовка оптического биосенсора к работе.

Микрожидкостная система оптического биосенсора Biacore 3000 перед проведением экспериментов очищалась растворами biadesorb solution-1 и biadesorb solution-2 при температуре 25°C. Процедура проводилась после установки в прибор специального чипа maintenance с параметрами инъекций растворов, рекомендованных производителем.

4.4.2. Подбор иммобилизационного буфера.

Для определения оптимальных условий иммобилизации белка на карбоксиметилированном декстрane чипа CM 5, провели исследование уровня электростатического концентрирования белка у поверхности оптического чипа в зависимости от значения pH буфера, в котором проводится иммобилизация. В качестве рабочего буфера использовали HBS-N (150 mM NaCl, 10 mM 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 [229] 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).

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

Низкомолекулярные соединения (№ 2-49, 51-58) растворялись в диметилсульфоксиде (ДМСО), а затем разводились до концентрации 100 мкМ HBS-N буфером от производителя, 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 готовились аналогичным образом, но вместо ДМСО использовался 99% этанол. Все опытные образцы ланостерола готовились непосредственно перед инъекцией в биосенсор.

4.4.4. 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 течении 7 минут при скорости потока 5 мкл/мин с последующей промывкой буфером HBS-N при той же скорости в течении 1 мин. Далее осуществляли иммобилизацию CYP51 путём пропускания его раствора (20 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (pH 5,0) по каналам оптического чипа CM5 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.

4.4.5. Анализ способности низкомолекулярных соединений взаимодействовать с CYP51 человека и *Candida albicans*.

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.

4.4.6. Регистрация кинетических и термодинамических параметров взаимодействий низкомолекулярных соединений с CYP51.

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 CYP51 человека: 5-50 мкМ (соединения №№ 43, 44, 45) и 1-10 мкМ (соединение №9), 10-100 мкМ (остальные соединения); а при работе с CYP51 *Candida albicans*: 10-100 мкМ (соединения №№ 41-50) – после окончания инъекции диссоциация комплексов «CYP51-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 CYP51 человека получали серии сенсограмм взаимодействий в диапазоне температур 10-40°C. Эксперименты повторяли не менее трёх раз.

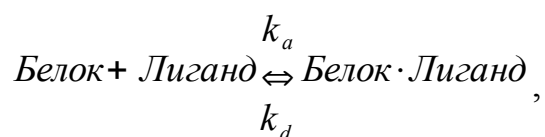
4.4.7. Обработка данных, полученный с помощью оптического биосенсора.

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), BIAevaluation 4.1 (GE Healthcare, США).

4.4.7.1. Рассчёт равновесной константы диссоциации.

Данные, полученные в ходе биосенсорных экспериментов, были обработаны программой BIAevaluation 4.1 («GE Healthcare», США).

При введении образца кинетический процесс образования и разрушения комплекса «белок-лиганд» может быть описан следующей схемой:



где k_a и k_d – константы скорости образования и разрушения комплекса белка с лигандом, соответственно.

Скорость образования комплекса «белок-лиганд» описывается следующим выражением:

$$\frac{d(\text{Белок} \cdot \text{Лиганд})}{dt} = k_a [\text{Белок}] [\text{Лиганд}] - k_d [\text{Белок} \cdot \text{Лиганд}]$$

где [Белок], [Лиганд] и [Белок·Лиганд] – концентрации иммобилизованного белка, лиганда в растворе и их комплекса, соответственно. Учитывая то, что один из компонентов (белок) иммобилизован на поверхности чипа, это выражение можно переписать следующим образом:

$$\frac{d(R)}{dt} = k_a (R_{\max} - R) \cdot C - k_d R = k_a R_{\max} \cdot C - R(k_a \cdot C + k_d) \quad (1),$$

где R – сигнал биосенсора, $R_{\max}$ – приращение сигнала при насыщении мест связывания иммобилизованного белка лигандом из раствора, C – концентрация лиганда. В условиях, когда раствор лиганда постоянно протекает через канал с иммобилизованным белком, концентрация лиганда практически не меняется со временем и межмолекулярные взаимодействия можно рассматривать как реакцию псевдопервого порядка.

Фаза равновесия может быть рассмотрена как частный случай фазы ассоциации, когда скорость образования комплекса «белок-лиганд» равна скорости разрушения. По определению в этом случае не происходит изменение

сигнала: $\frac{d(R)}{dt} = 0$.

При равновесии уравнение 1 можно переписать следующим образом:

$$0 = k_a (R_{\max} - R_{eq}) \cdot C - k_d R_{eq},$$

где R_{eq} – приращение сигнала биосенсора в равновесном состоянии.

После преобразований получаем:

$$R_{eq} = \frac{C \cdot R_{\max}}{C + \frac{k_d}{k_a}}.$$

Заменяя $K_D = k_d/k_a$ получаем: $R_{eq} = \frac{C \cdot R_{max}}{C + K_D}$ (2).

При помощи уравнения 2 определяют равновесную константу диссоциации K_D , так как K_D представляет собой концентрацию лиганда, при которой $R_{eq} = 1/2 \cdot R_{max}$. Этот метод реализован в программе BIAevaluation 4.1 с помощью процедуры «Steady state affinity» (рис. 4).

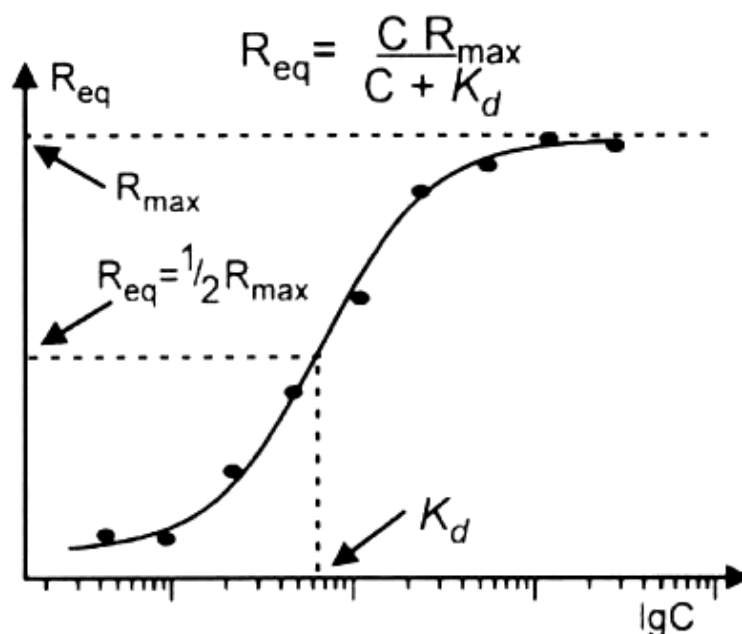


Рис. 9. Методика расчёта K_D через равновесные сигналы биосенсора [230].

4.4.7.2. Расчёт термодинамических параметров взаимодействия низкомолекулярных соединений с CYP51A1.

Были рассчитаны значения равновесной константы диссоциации комплекса «CYP51A1-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 энтальпии $\Delta H/R$ (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.

4.4.7.3. Оценка качества фитирования.

Фит (модель взаимодействия, построенная на основе экспериментальной сенсограммы) строился программой BIAevaluation 4.1 (General Electric Healthcare Bio-Science AB, Швеция).

Качество фита оценивалось по трём параметрам, два из которых вычислялись программой BIAevaluation 4.1 (стандартная ошибка и χ^2):

1. χ^2 – среднее квадратичное отклонение точек данных от точек построенной модели. Наилучшими признавались фиты со значением χ^2 меньшим 10. Однако, в случае, если полученные сенсограммы при фитировании давали значение χ^2 большее 10 единиц, то за конечный результат принимался фит с наименьшим значением χ^2 , причём значение последнего должно было быть значительно меньше $R_{\max}$. χ^2 вычисляется по формуле:

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (r_f - r_x)^2}{n - p}$$

Где r_f – фитированное значение параметра в данной точке, r_x – экспериментально полученное значение того же параметра в той же самой точке, n – количество точек данных, p – количество параметров, подвергаемых фитингу. Для сенсограмм взаимодействия n много больше p , и χ^2 сокращается до среднего

квадратичного отклонения точек экспериментальной кривой от точек кривой, построенной с помощью модели.

2. Стандартная ошибка – расчётный параметр для каждой полученной характеристики фита, который характеризует чувствительность модели к изменению данной характеристики.

3. Визуальное соответствие модельного графика и записанной в режиме реального времени сенсограммы.

4.5. 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 финальных 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%.

4.5.1. 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 «белок-низкомолекулярное соединение». 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 данном случае CYP51, составляет 1 мкМ.

4.6. Биохимическое тестирование на способность низкомолекулярных соединений ингибировать CYP51A1 человека.

Активность CYP51A1 измерялась в реконструированной системе при 37 °C 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. Итоговая реакционная смесь содержала 0,5 мкМ CYP51 человека, 1 μМ CPR, 1 мМ НАДФ·Н, 8 мМ изоцитрата и 0,1 U изоцитрат дегидрогеназы, 100 мкМ ланостерола. Низкомолекулярные соединения (10 мМ раствор в этаноле) добавлялись к реакционной смеси до финальной концентрации концентрации 1, 10, 50 мкМ. 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. Стероиды определялись УФ-детектором при длине волны 254 нм и оценивались по характеристике масса/заряд в спектре m/z по методике, описанной Trosken и соавт. [211].

5. Результаты и их обсуждение.

5.1. Подбор иммобилизационного буфера.

Был проведён подбор иммобилизационного буфера для CYP51A1 по стандартной методике производителя. Результаты представлены на рисунке 10.

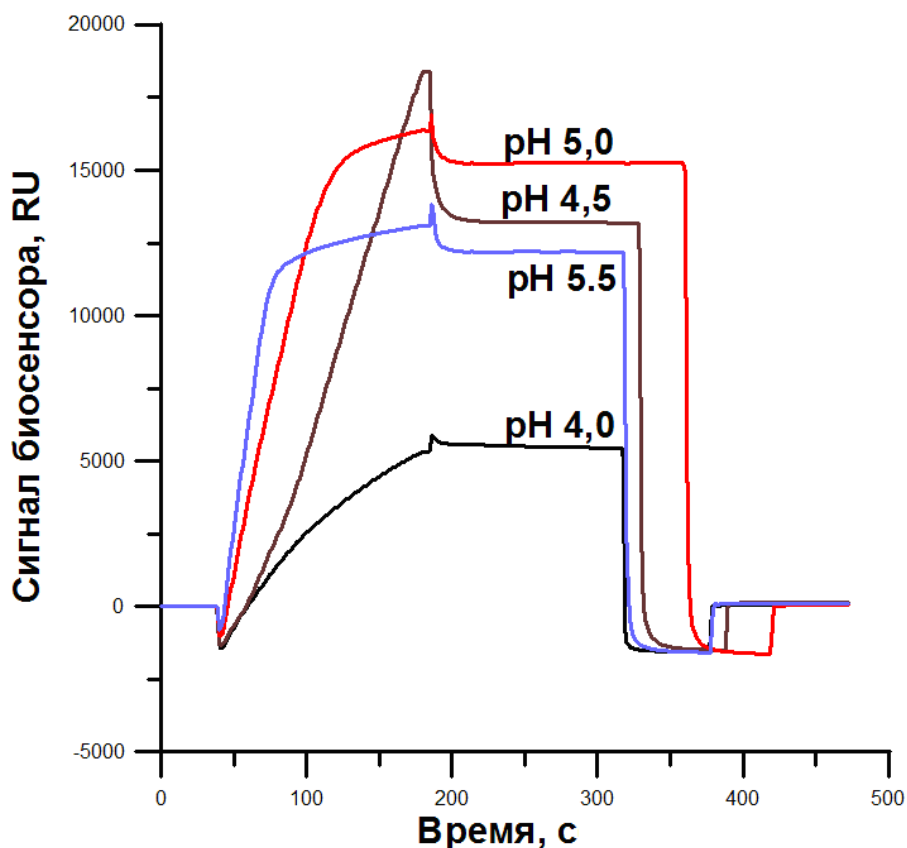


Рис. 10. Сенсограммы поиска pH буфера, оптимального для иммобилизации CYP51A1.

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. Из рисунка 10 видно, что наибольшее электростатическое концентрирование CYP51A1 (выраженное в виде скорости накопления сигнала биосенсора) у поверхности чипа обеспечивал буфер с pH равным 5,5. Однако, при использовании данного буфера насыщение поверхности оптического чипа

достигалось за меньшее время, что ограничивало возможности иммобилизации. 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. Минимум электростатической концентрации и остаточного связывания белка с поверхностью чипа был обнаружен при использовании иммобилизационного буфера с pH равным 4,0.

5.2. Иммобилизация CYP51A1.

CYP51A1 был иммобилизован на карбоксиметилдекстрановой поверхности чипа CM5. Типичная сенсограмма иммобилизации представлена на рис. 11.

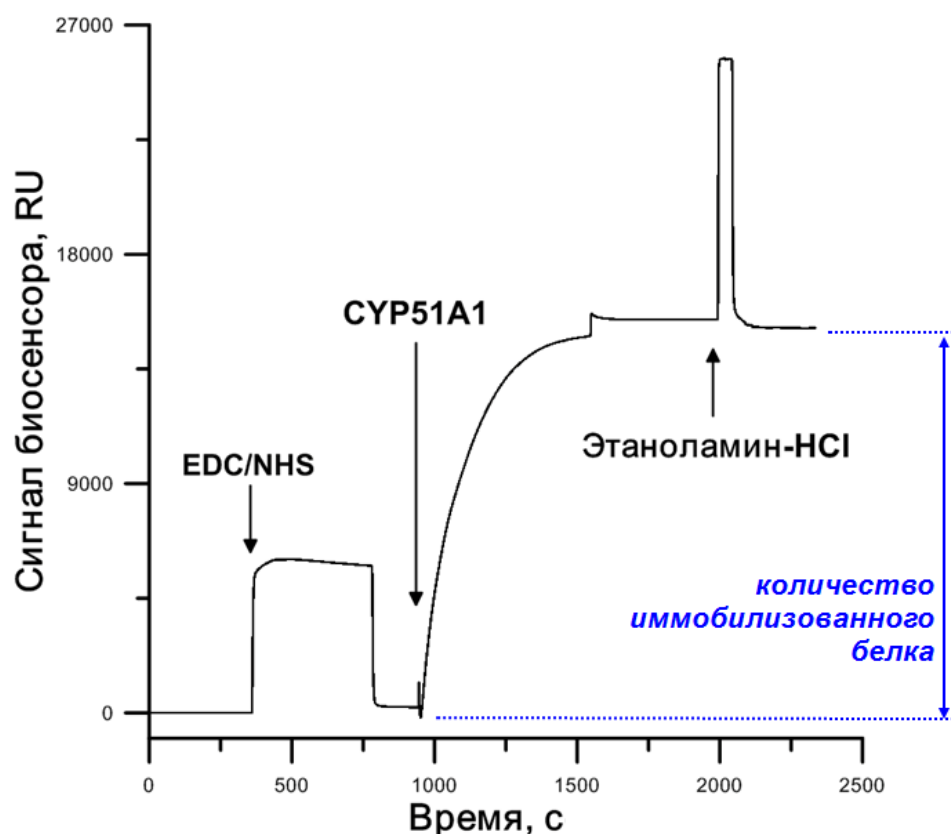


Рис. 11. Типичная сенсограмма иммобилизации CYP51A1 на поверхности оптического чипа CM5. Стрелками указаны моменты начала инъекций активирующей смеси EDC/NHS, CYP51A1, этаноламина.

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.

5.3. 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. При этом, в отличие от ланостерола (природного субстрата) данные вещества имеют значительно больший молекулярный вес и разветвленную структуру. Также в выборке присутствовал ряд азольных соединений, включая известный ингибитор цитохрома CYP51A1 кетоконазол [231] в качестве положительного контроля для соединений этого класса. 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. 12). Нужно отметить, что из 8 азольных соединений (№№ 51-58) способность связываться с иммобилизованным CYP51 показал только кетоконазол, что согласуется с литературными данными о том, что это соединение является ингибитором CYP51A1.

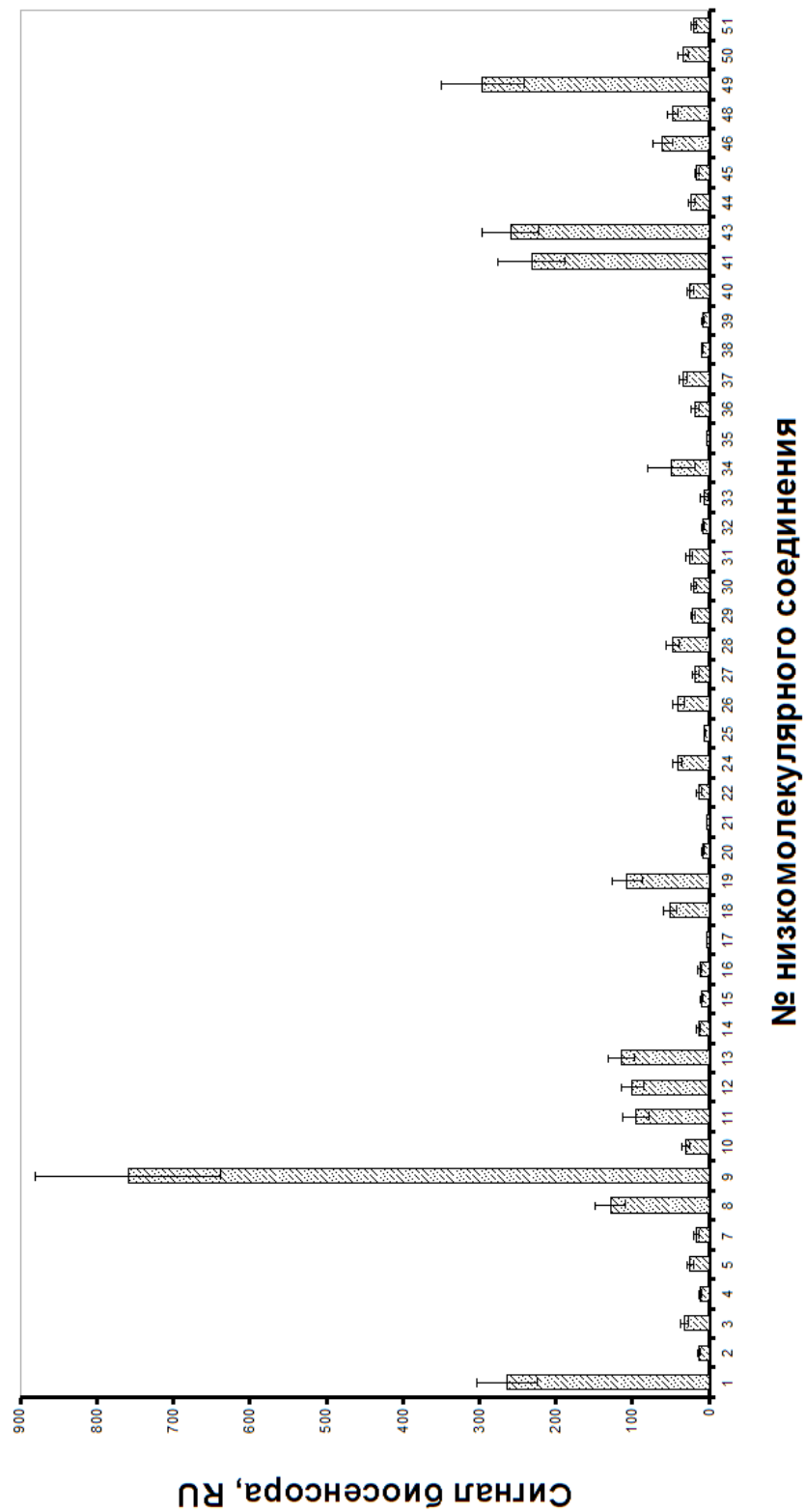


Рис. 12. Анализ способности низкомолекулярных соединений взаимодействовать с CYP51A1. Концентрация соединений 30 мкМ. Уровень иммобилизации белка – 15000 RU.

5.4. Анализ аффинности взаимодействия низкомолекулярных соединений с CYP51A1.

Для соединений, показавших на скрининге уровень сигнала, превышающий 15 RU (уровень отсечения был введён эмпирически для выбраковки наименее активно связывающихся с иммобилизованным белком соединений, поскольку низкий уровень связывания свидетельствует о более низкой скорости образования комплексов «иммобилизованный белок-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 K_D комплексов «CYP51A1-низкомолекулярное соединение».

Сигнал биосенсора для контрольного образца, содержащего только ДМСО в соответствующем разведении, был существенно ниже сигналов для низкомолекулярных соединений, например голотурин А.

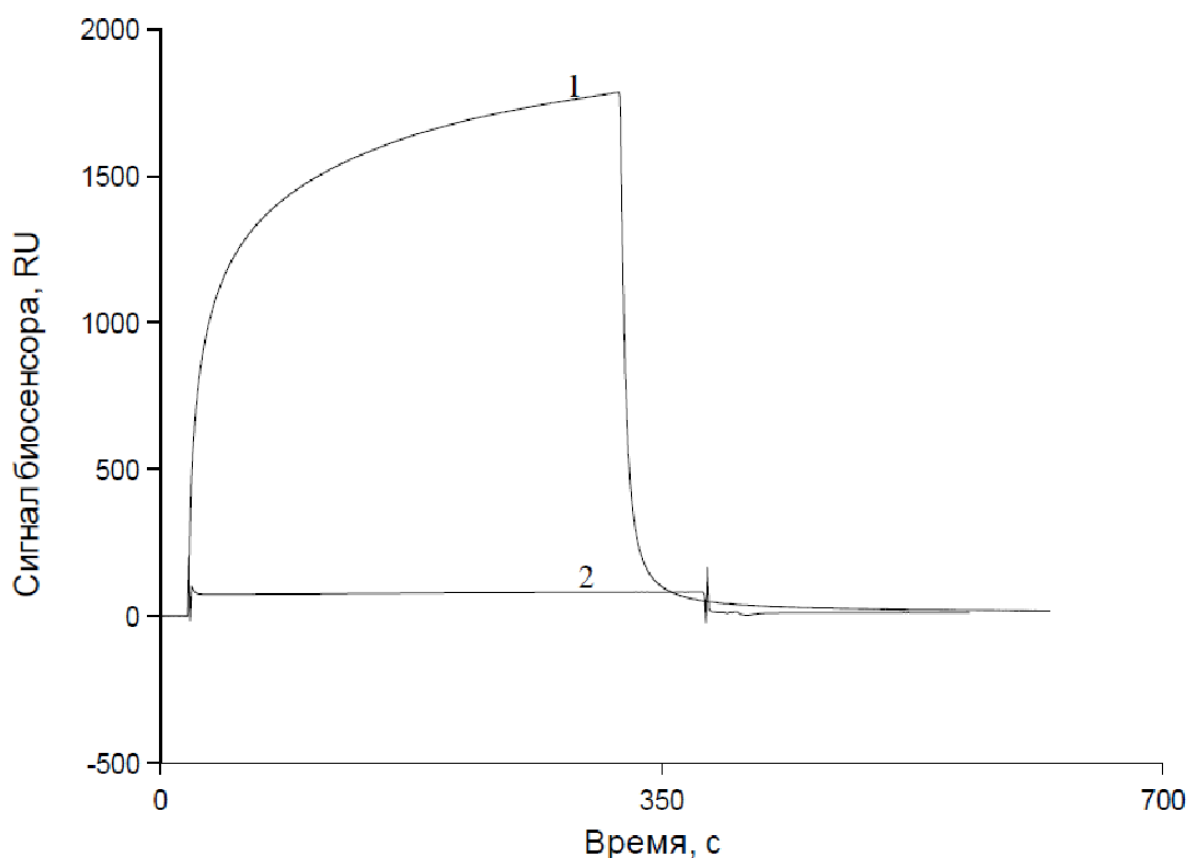


Рис. 13. Типичные сенсограммы. 1 – 50 мкМ голотурин А, 2 – буфер с 3% ДМСО.

Каждое измерение проводилось в трёх повторах. Типичные сенсограммы

взаимодействий данных соединений с иммобилизованным CYP51A1, записанные в реальном времени, представлены на рисунках 14-42. 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.

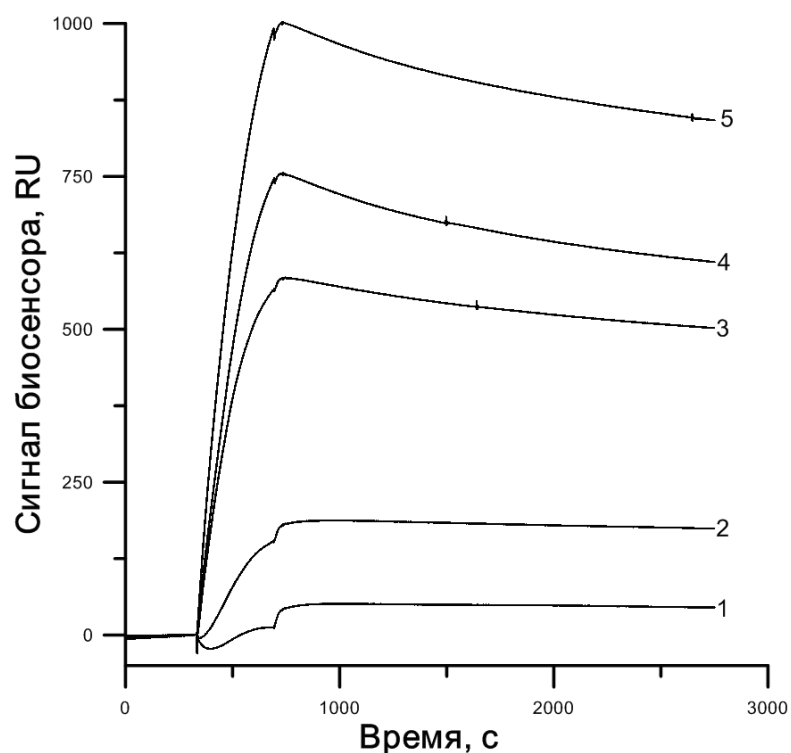


Рис. 14. Сенсограммы взаимодействия ланостерола в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

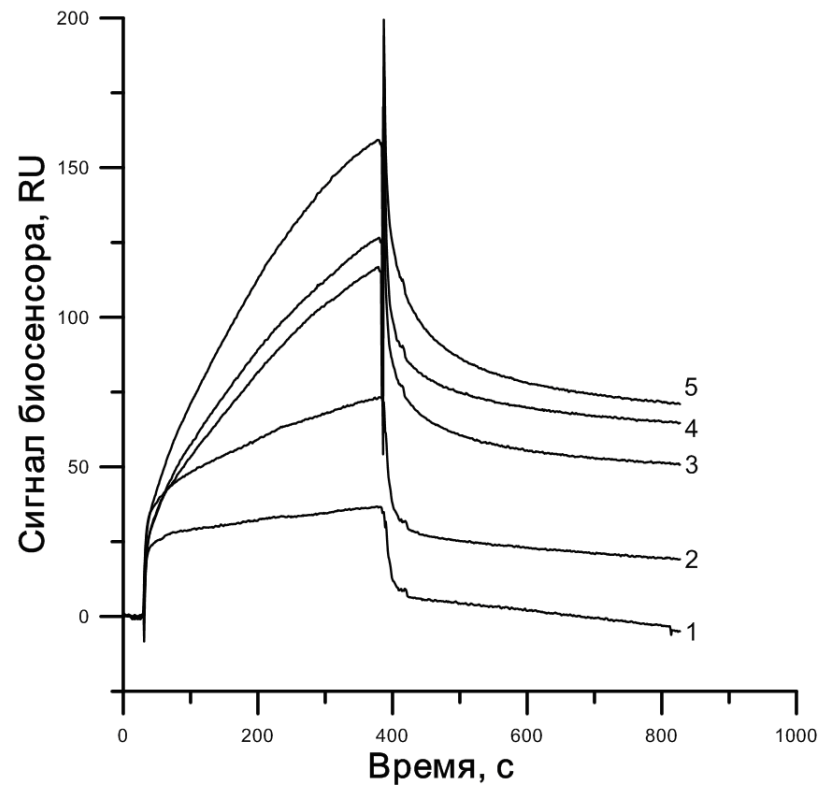


Рис. 15. Сенсограммы взаимодействия томатызида в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

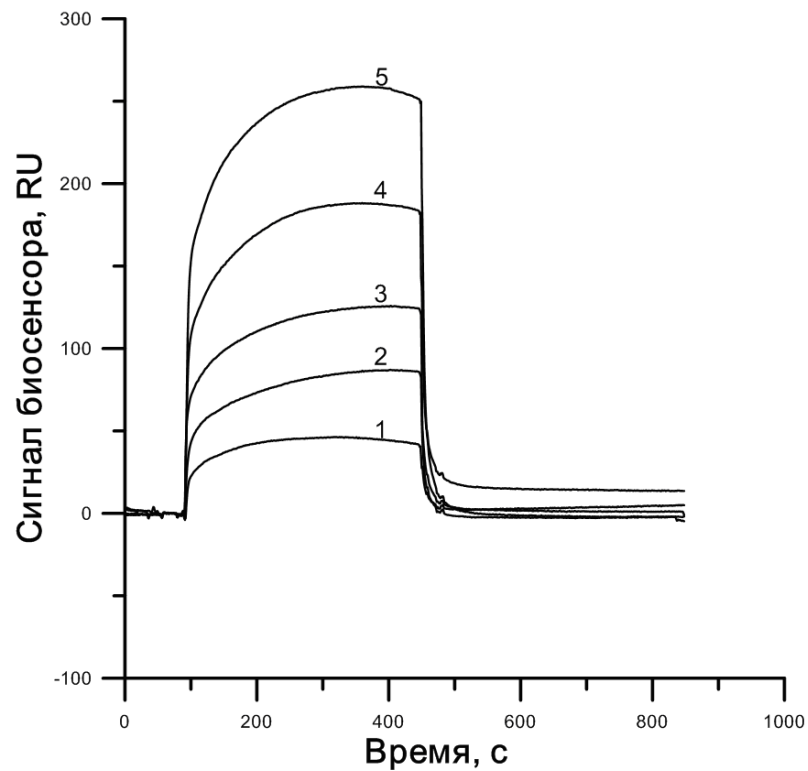


Рис. 16. Сенсограммы взаимодействия f-гитонина в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

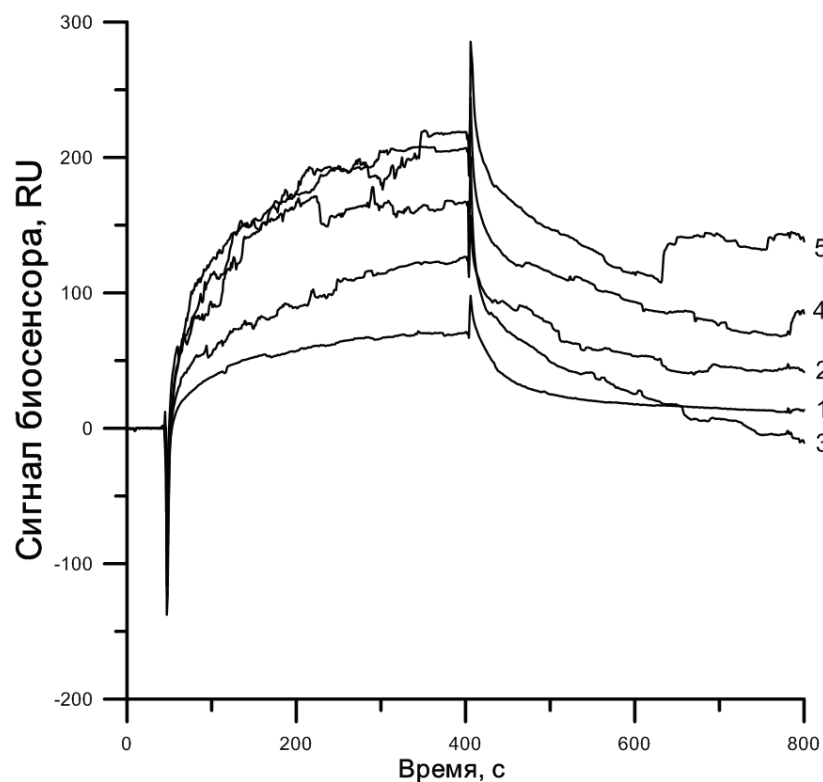


Рис. 17. Сенсограммы взаимодействия функиозида Н в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

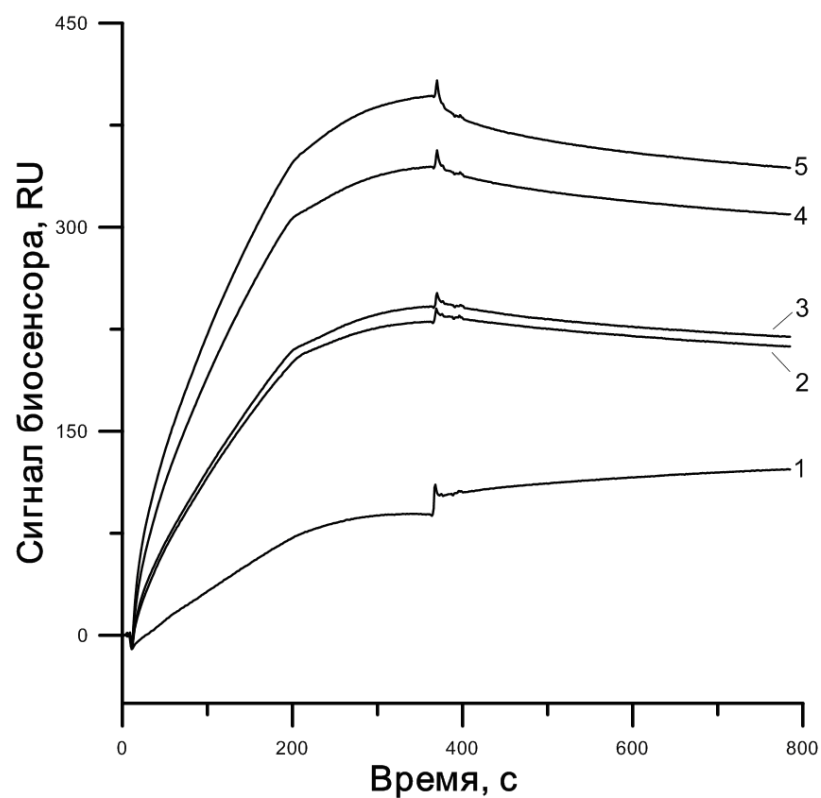


Рис. 18. Сенсограммы взаимодействия капсикозида А в концентрациях 1 мкМ (1), 4 мкМ (2), 5 мкМ (3), 7 мкМ (4), 10 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

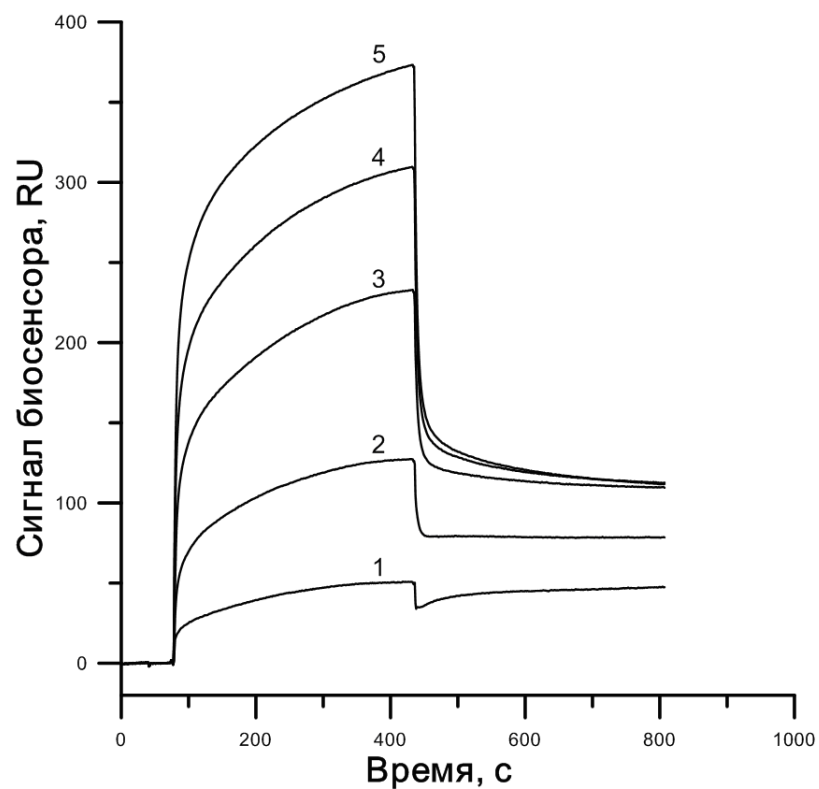


Рис. 19. Сенсограммы взаимодействия капсикозина в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

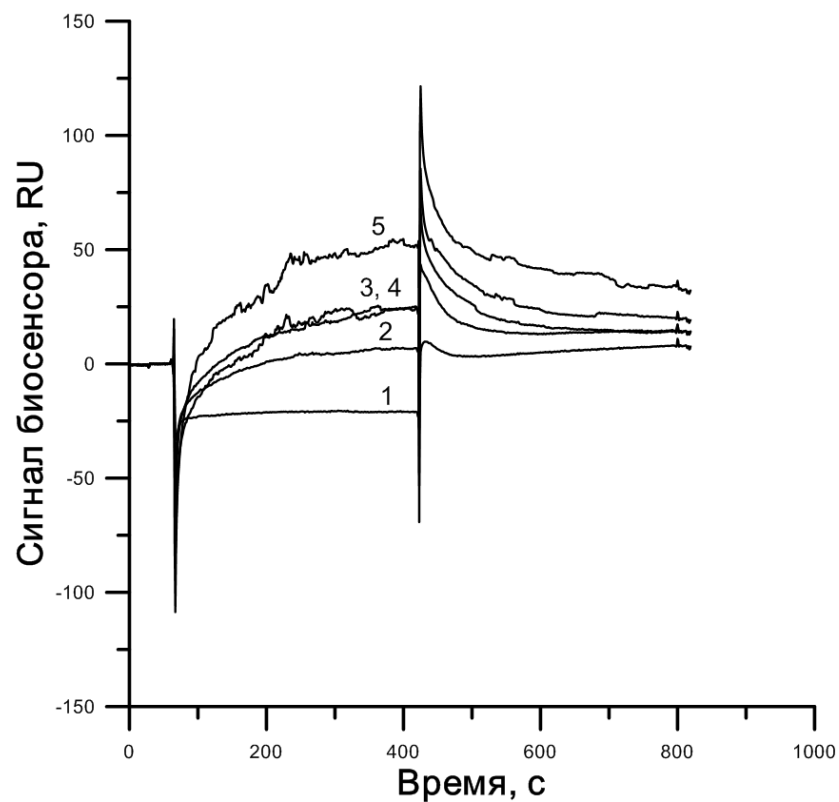


Рис. 20. Сенсограммы взаимодействия функиозида F в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

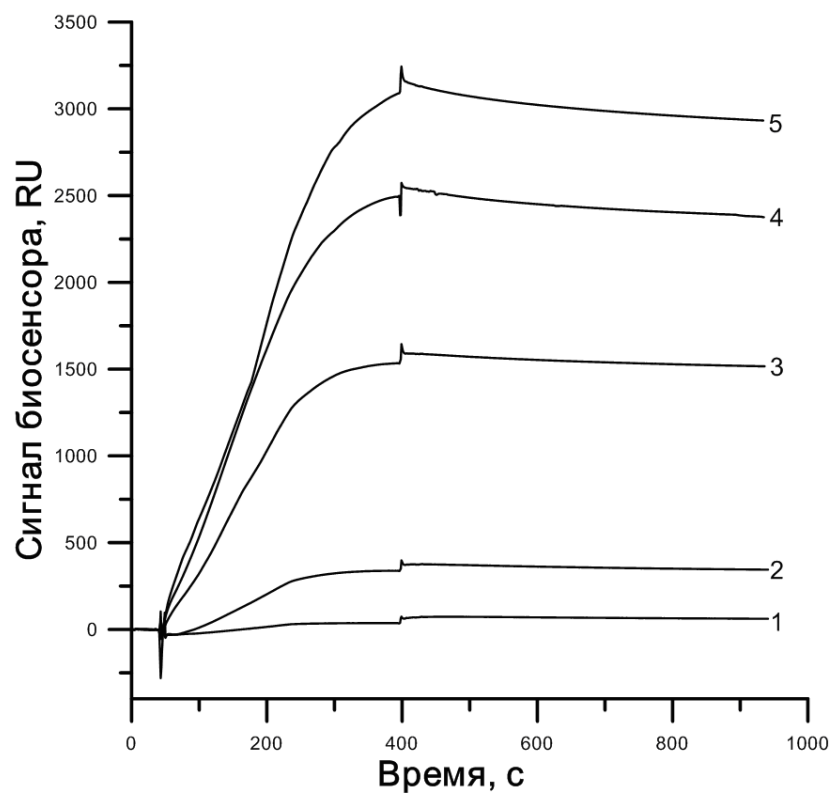


Рис. 21. Сенсограммы взаимодействия ацетата β -ситостерина в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

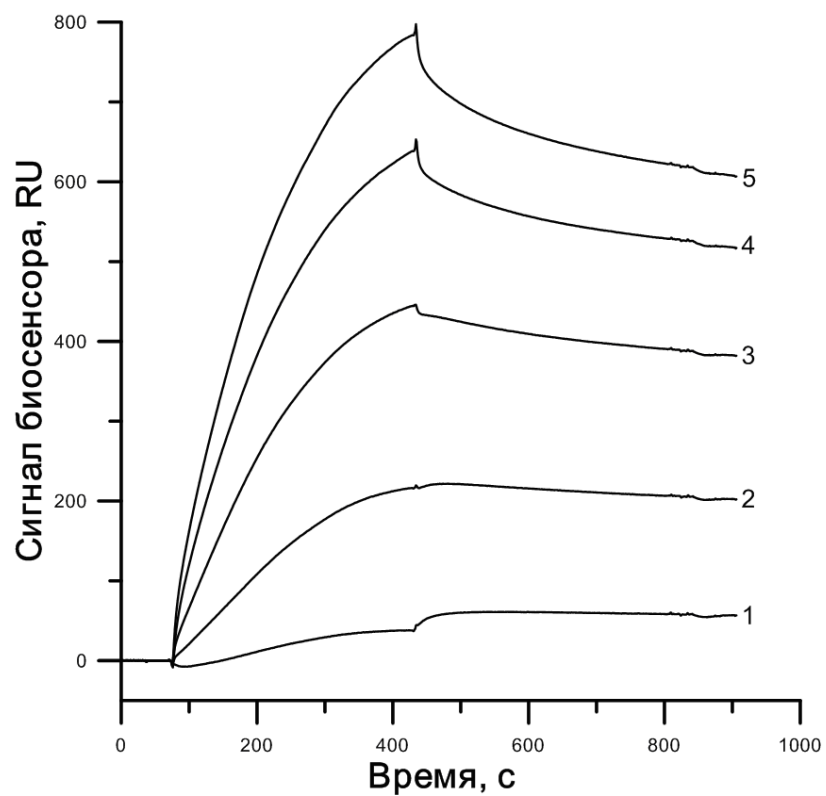


Рис. 22. Сенсограммы взаимодействия β -ситостерина в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

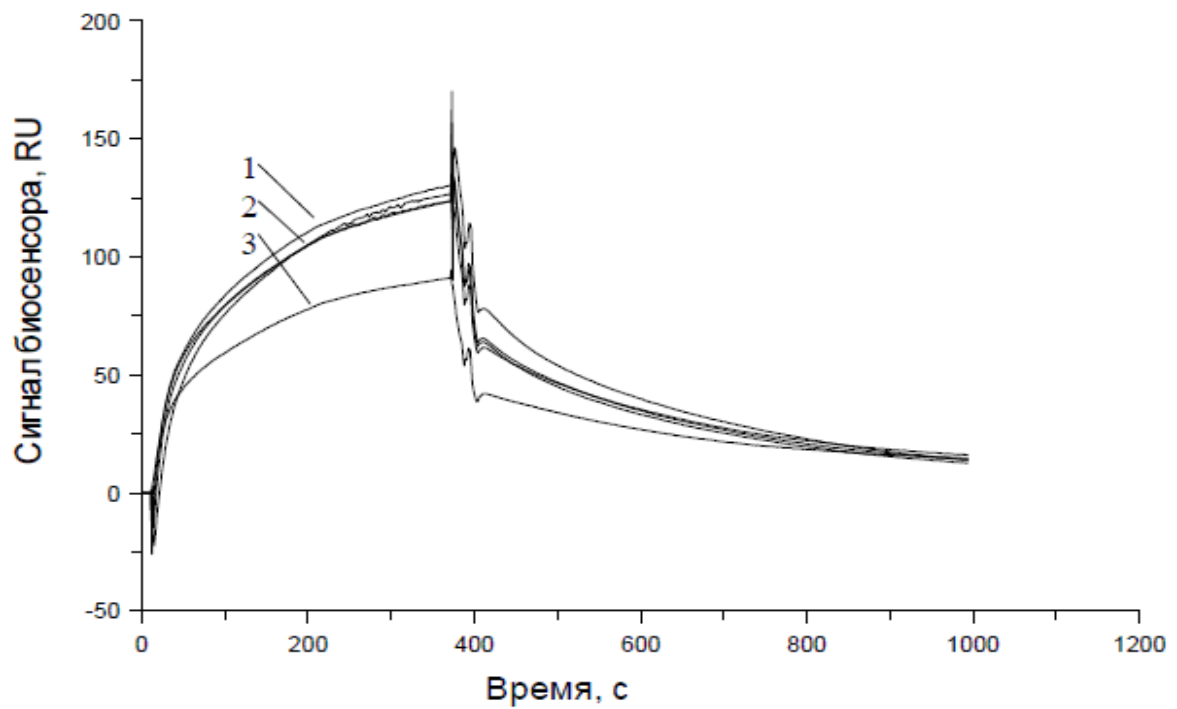


Рис. 23. Сенсограммы взаимодействия мальтозида бетулина С-3 в концентрациях 10 мкМ (3), 25, 50, 75 мкМ (2), 100 мкМ (1) с CYP51A1 при 25°C.

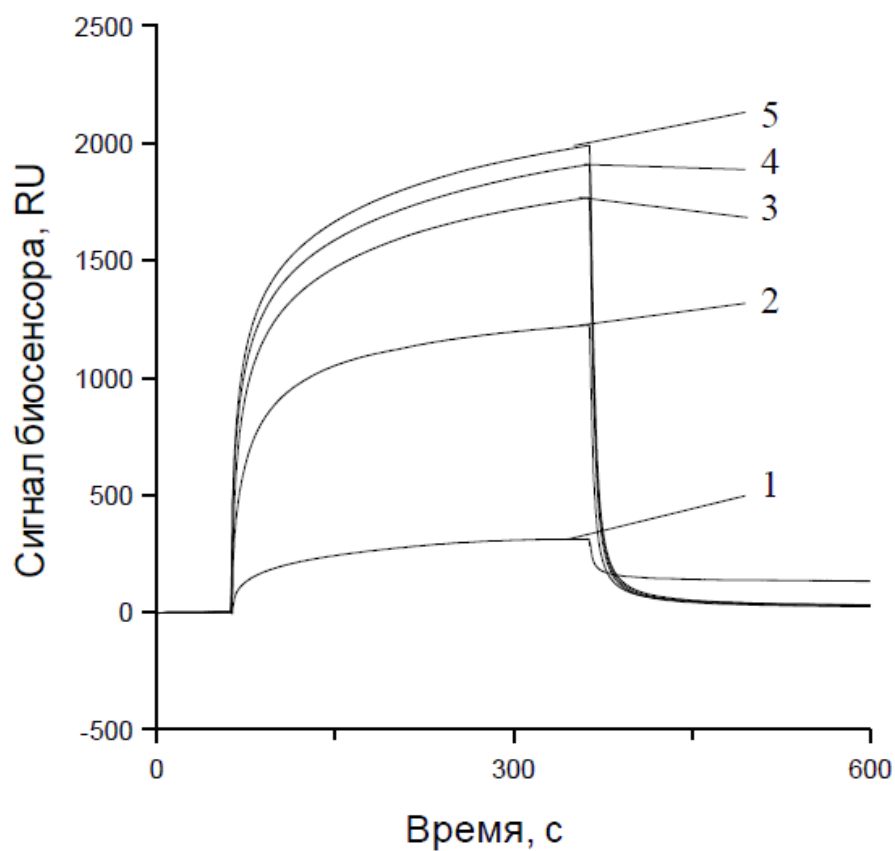


Рис. 24. Сенсограмма взаимодействия голотурина А в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP 51 при 25°C.

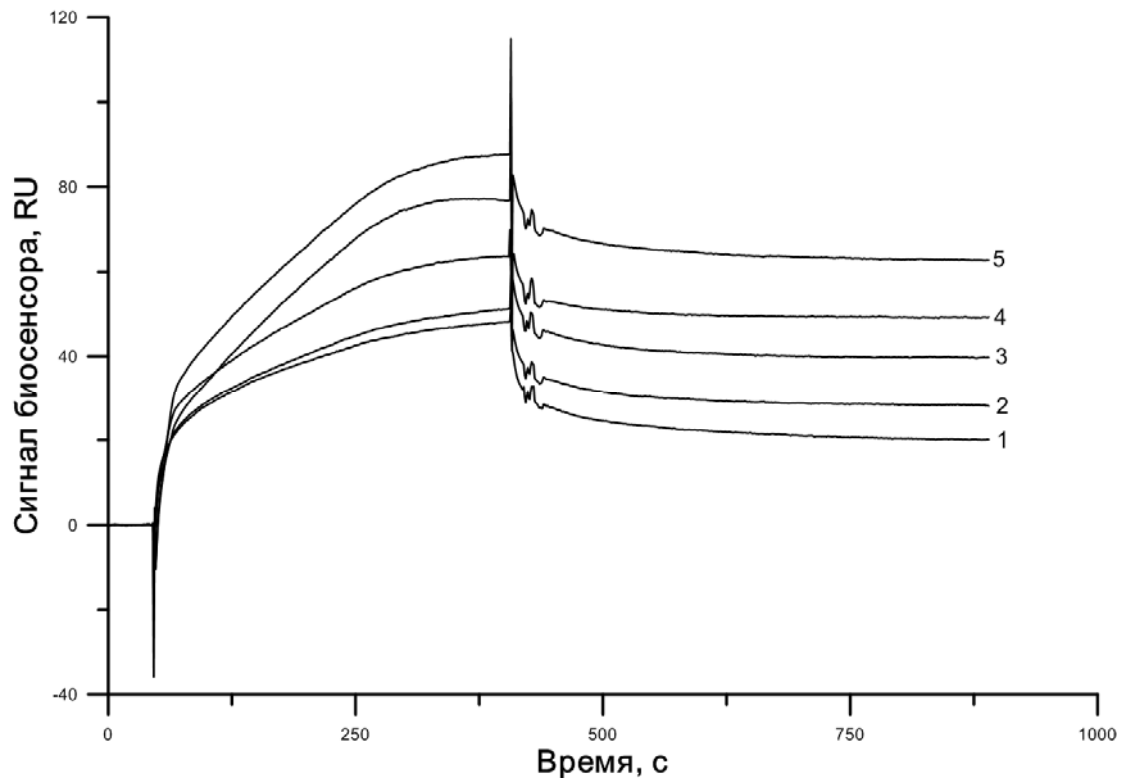


Рис. 25. Сенсограммы взаимодействия дигитонина в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

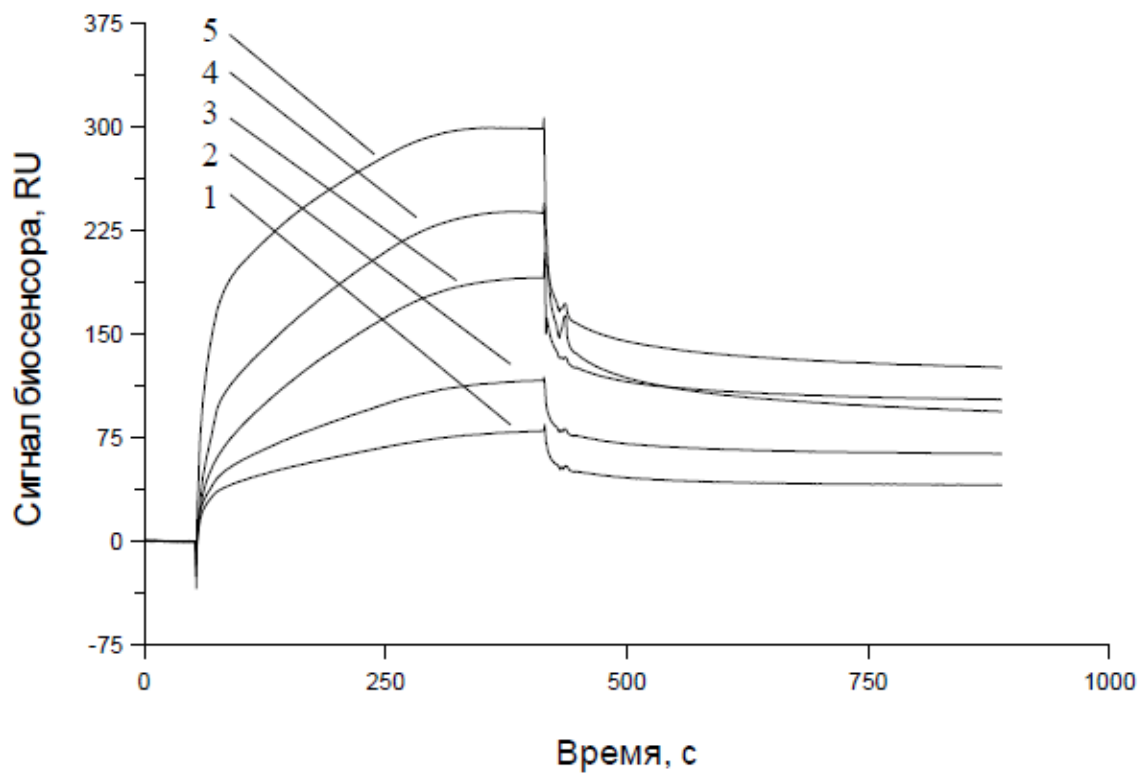


Рис. 26. Сенсограммы взаимодействия каулозида D в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

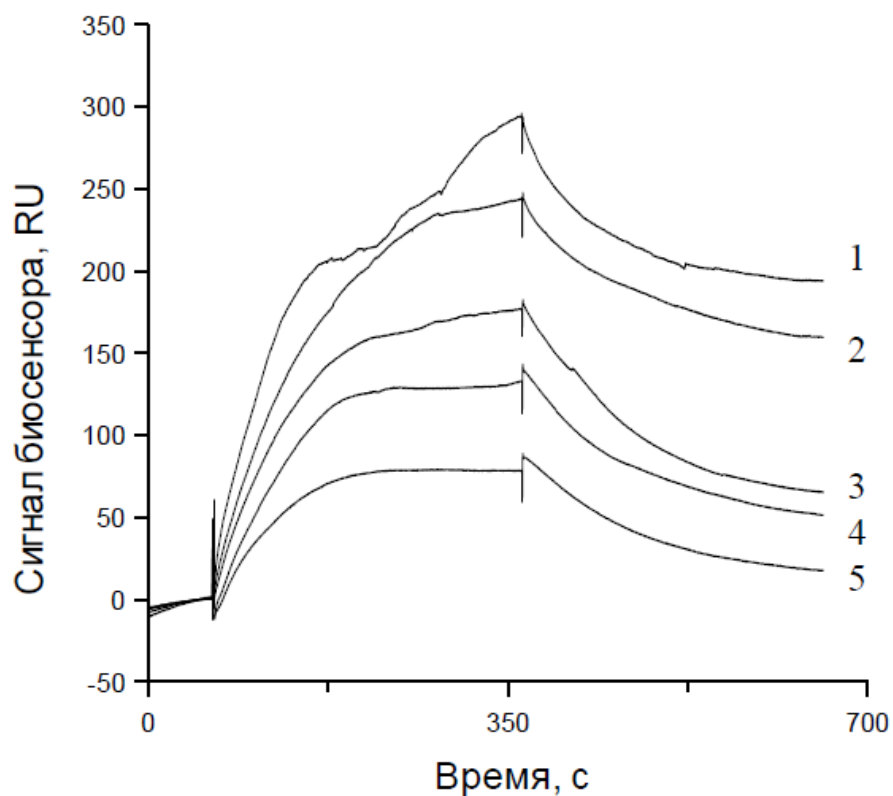


Рис. 27. Сенсограммы взаимодействия бетулафолиентриола в концентрациях 10 мкМ (5), 25 мкМ (4), 50 мкМ (3), 75 мкМ (2), 100 мкМ (1) с CYP51A1 при 25°C.

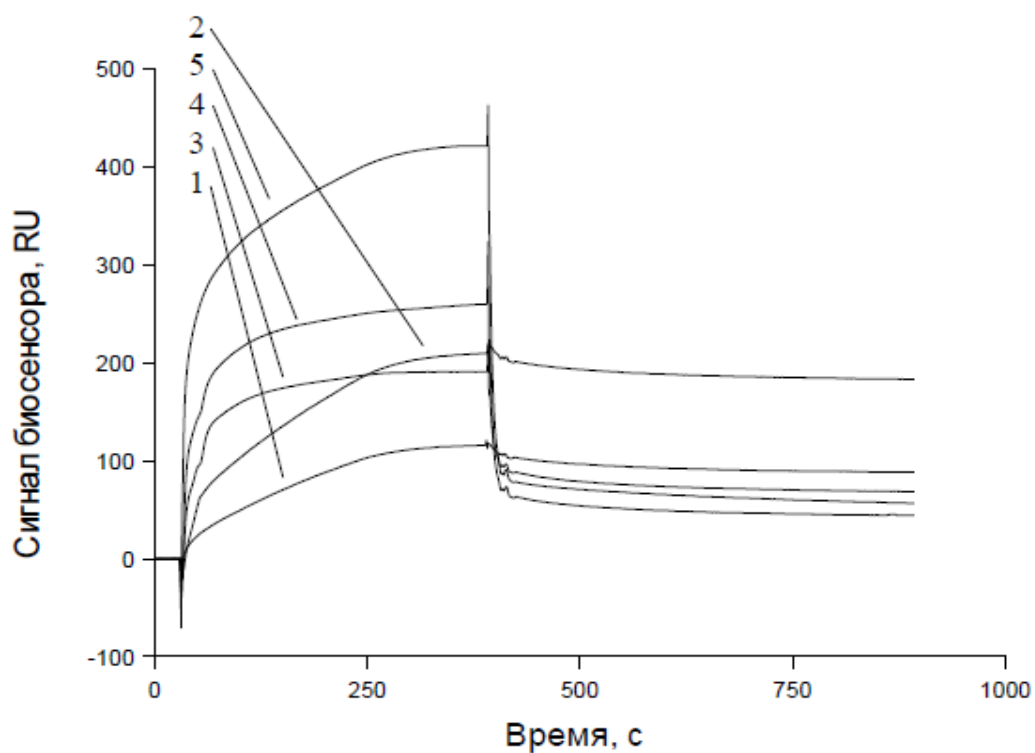


Рис. 28. Сенсограммы взаимодействия стихопозида В в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

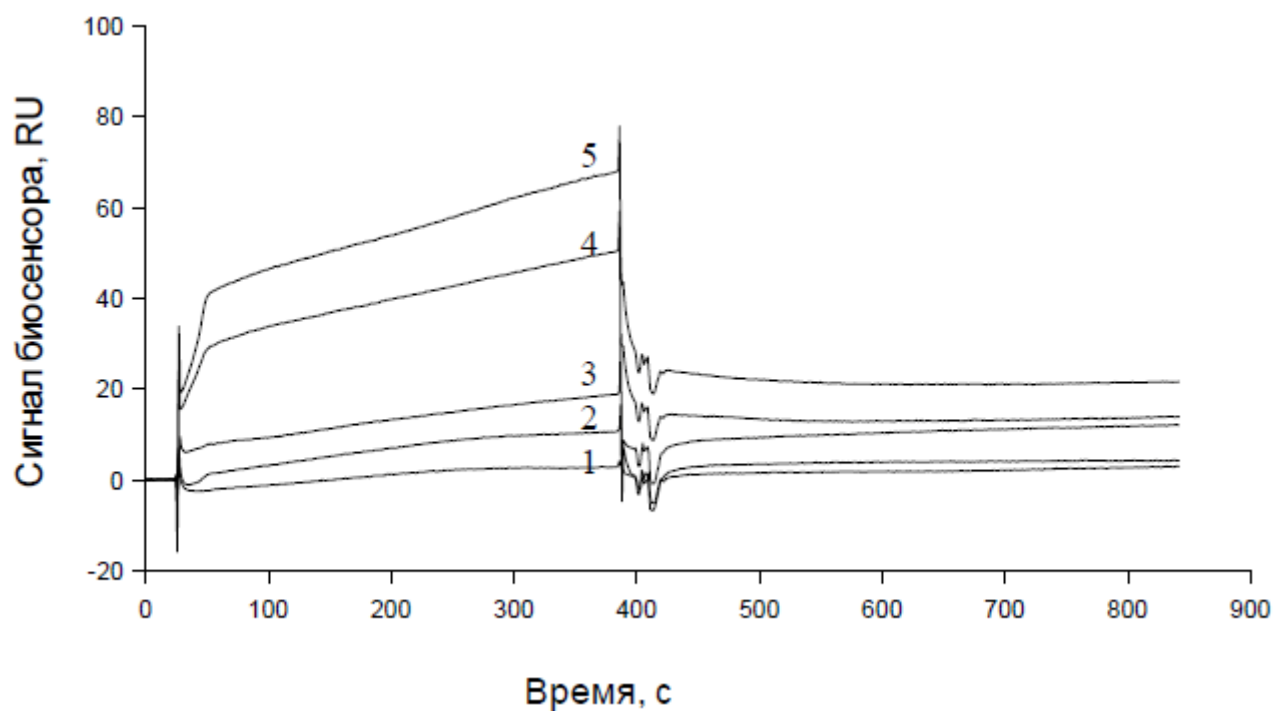


Рис. 29. Сенсограммы взаимодействия мальтозида холестерина в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

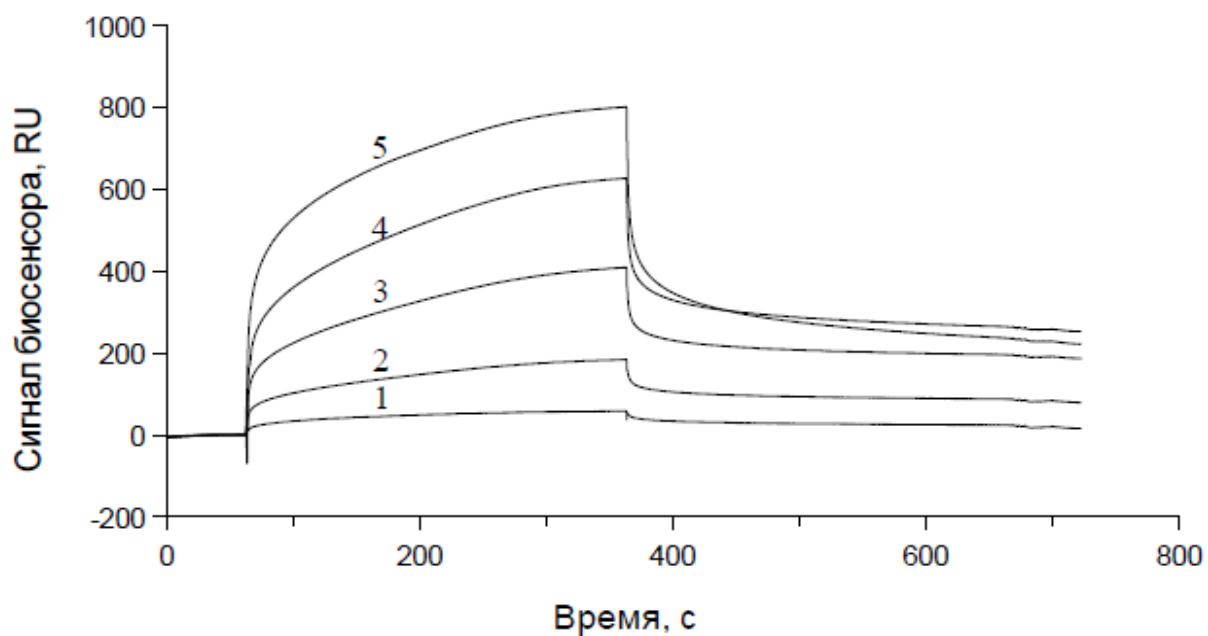


Рис. 30. Сенсограммы взаимодействия теасапонина в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

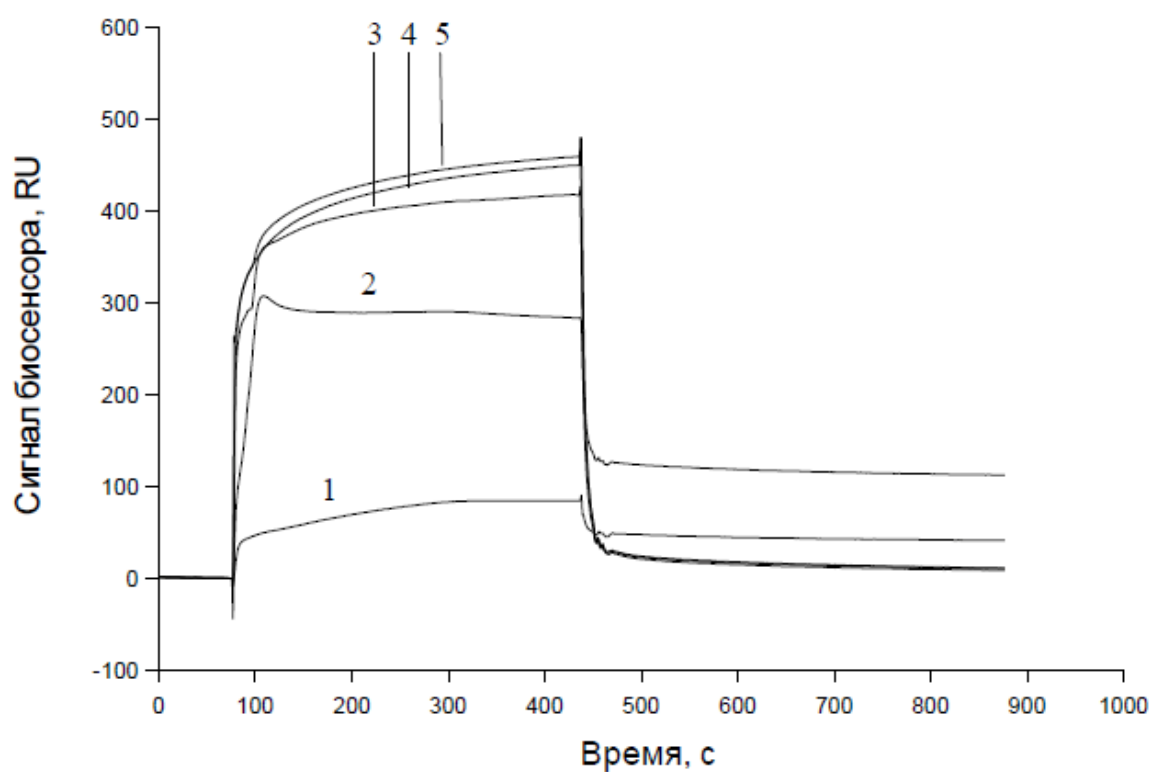


Рис. 31. Сенсограммы взаимодействия стихопозида С в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

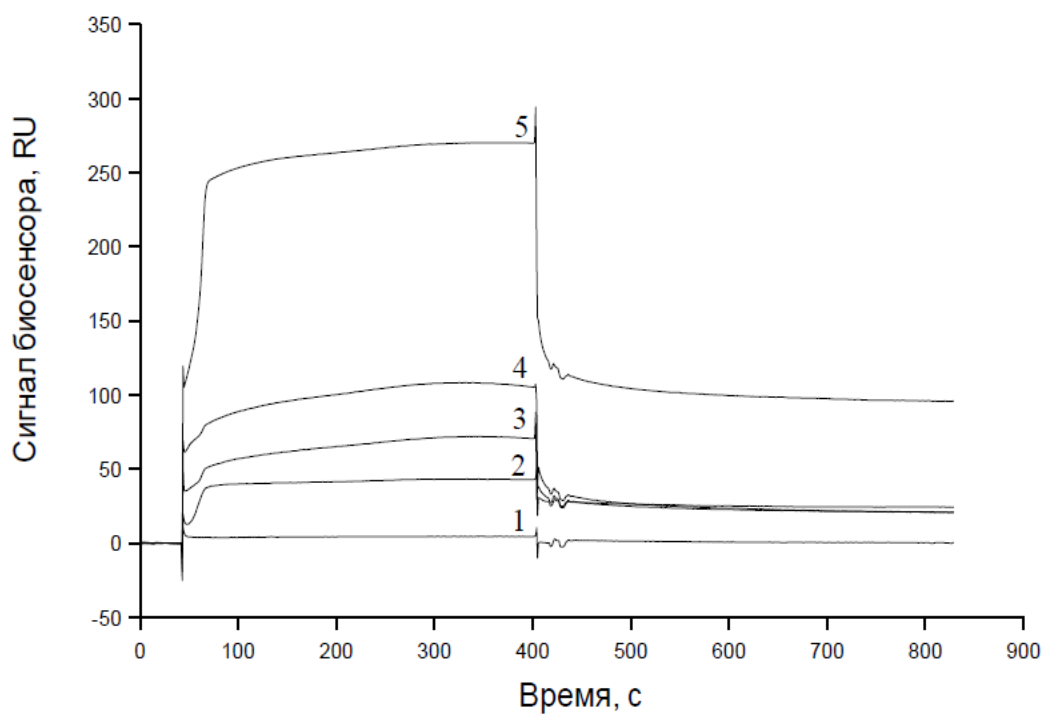


Рис. 32. Сенсограммы взаимодействия каулозида С в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

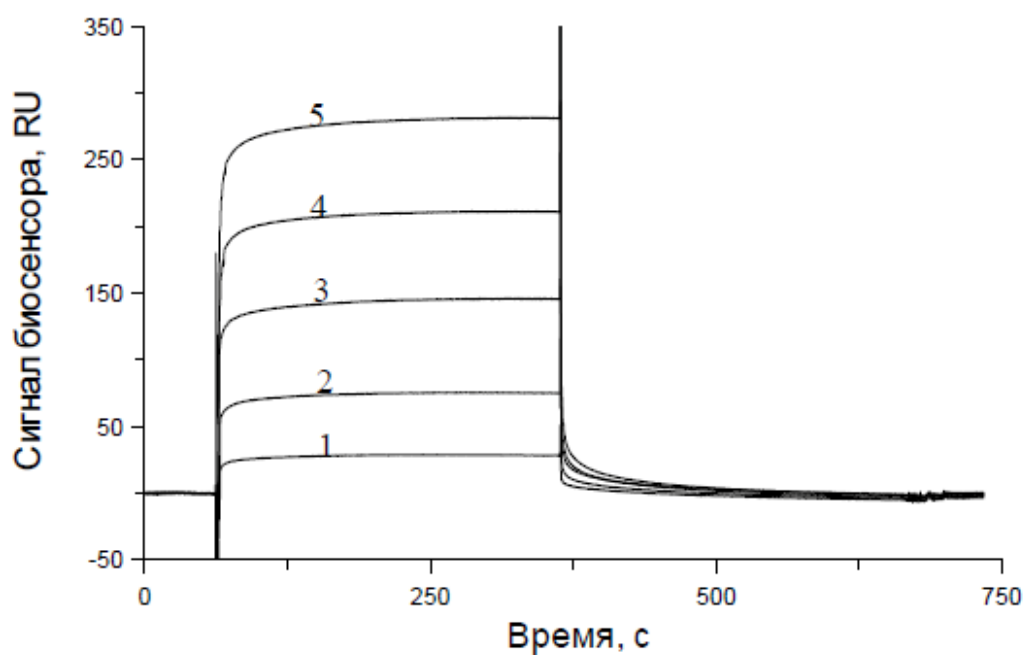


Рис. 33. Сенсограммы взаимодействия глицирризиновой кислоты в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3), 75 (мкМ), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

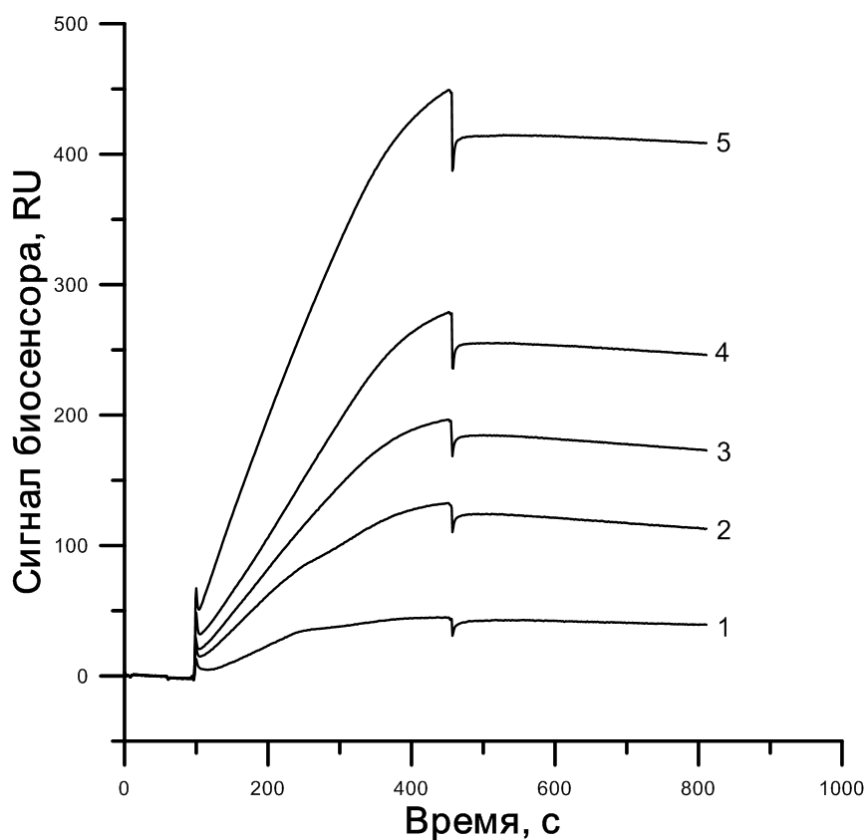


Рис. 34. Сенсограммы взаимодействия АТ-2 в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ(3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

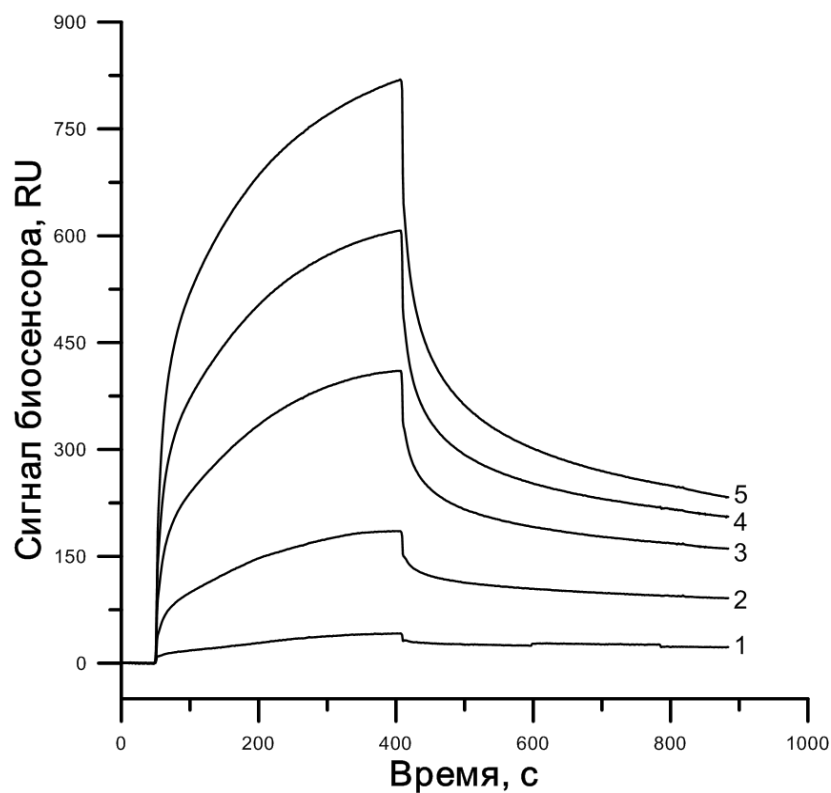


Рис. 35. Сенсограммы взаимодействия АТ-10 в концентрациях 5 мкМ (1), 10 мкМ (2), 25 мкМ(3), 40 мкМ (4), 50 мкМ (5) с СYP51A1 при 25°C.

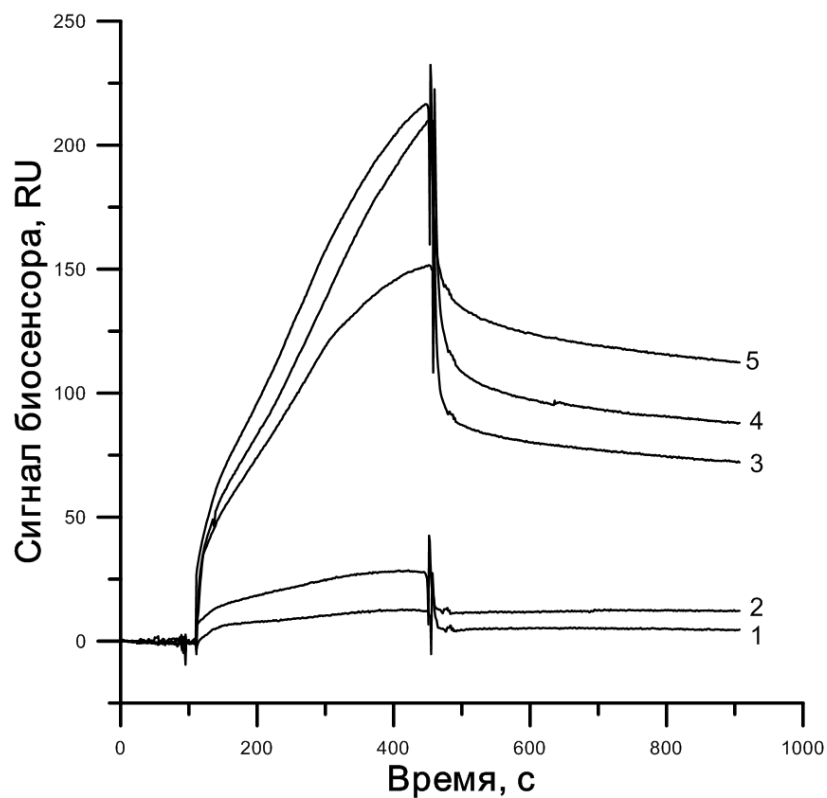


Рис. 36. Сенсограммы взаимодействия HD-1 в концентрациях 5 мкМ (1), 10 мкМ (2), 25 мкМ(3), 40 мкМ (4), 50 мкМ (5) с СYP51A1 при 25°C.

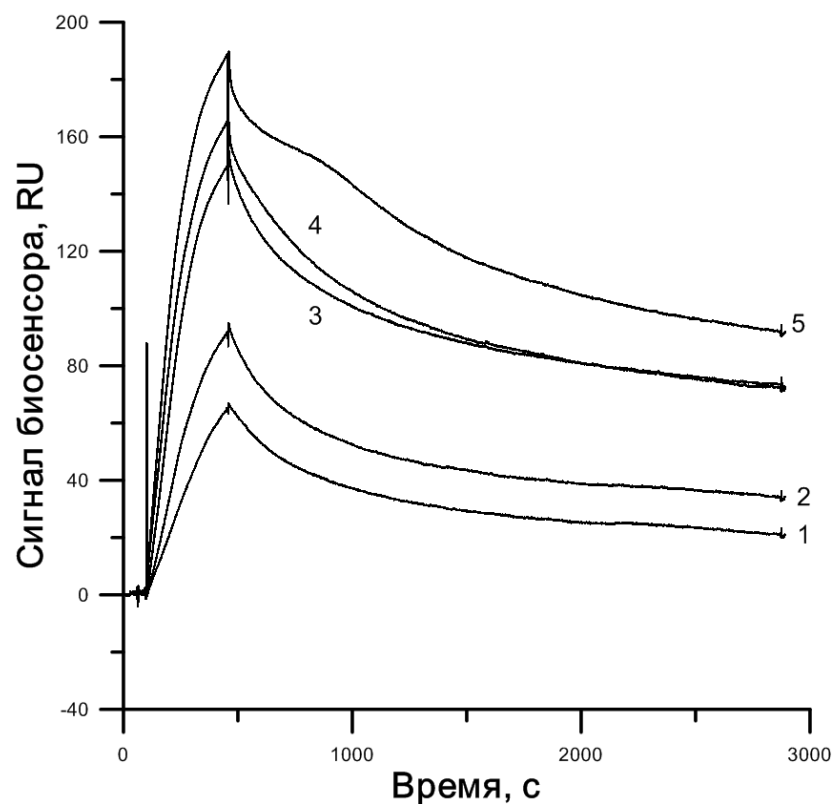


Рис. 37. Сенсограммы взаимодействия HD-2 в концентрациях 5 мкМ (1), 10 мкМ (2), 25 мкМ(3), 40 мкМ (4), 50 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

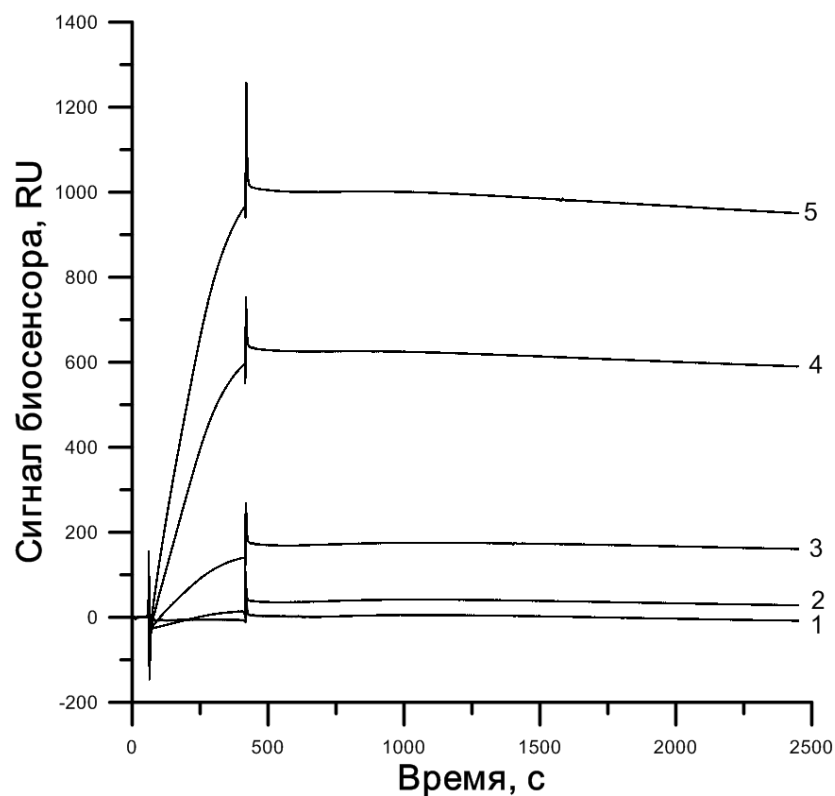


Рис. 38. Сенсограммы взаимодействия PP1 в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ(3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

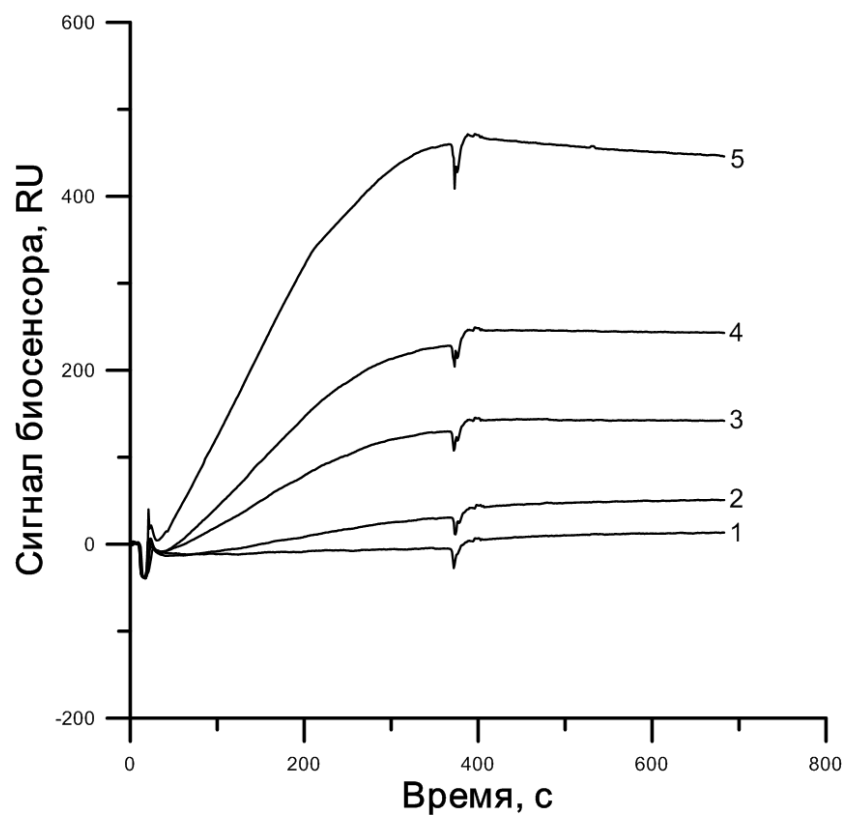


Рис. 39. Сенсограммы взаимодействия PP4 в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ(3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

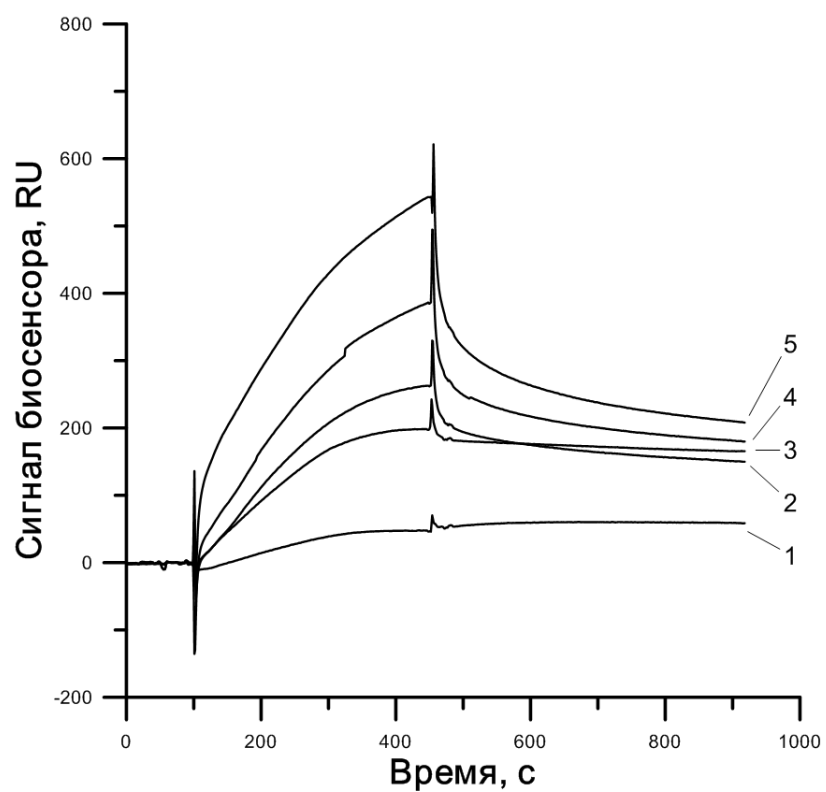


Рис. 40. Сенсограммы взаимодействия D1 в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (3), 50 мкМ(2), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

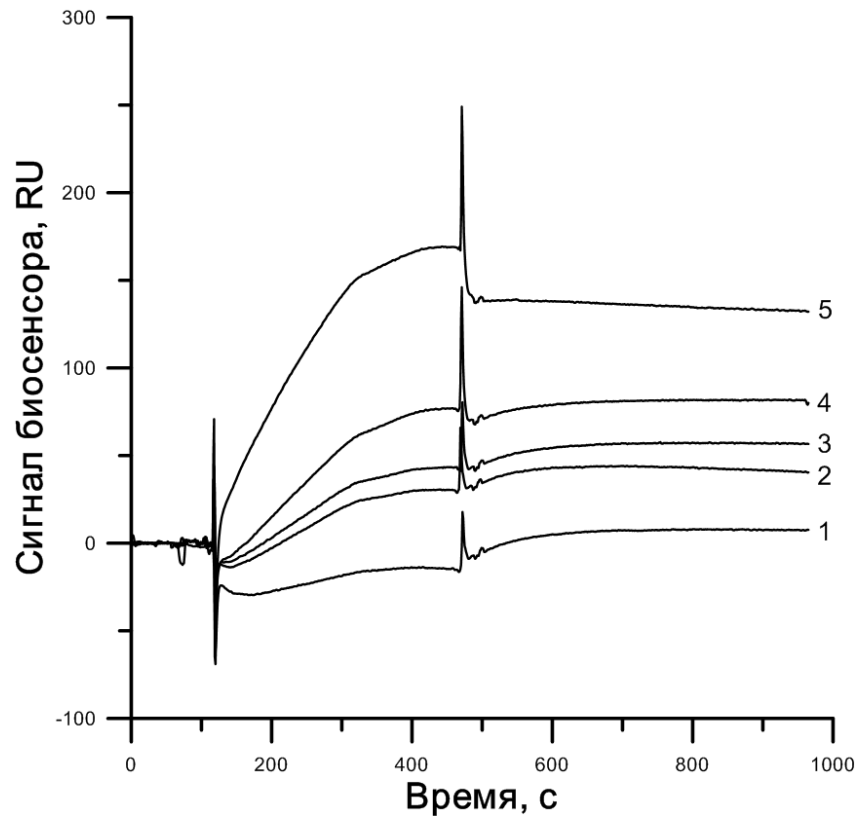


Рис. 41. Сенсограммы взаимодействия ТА в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ(3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

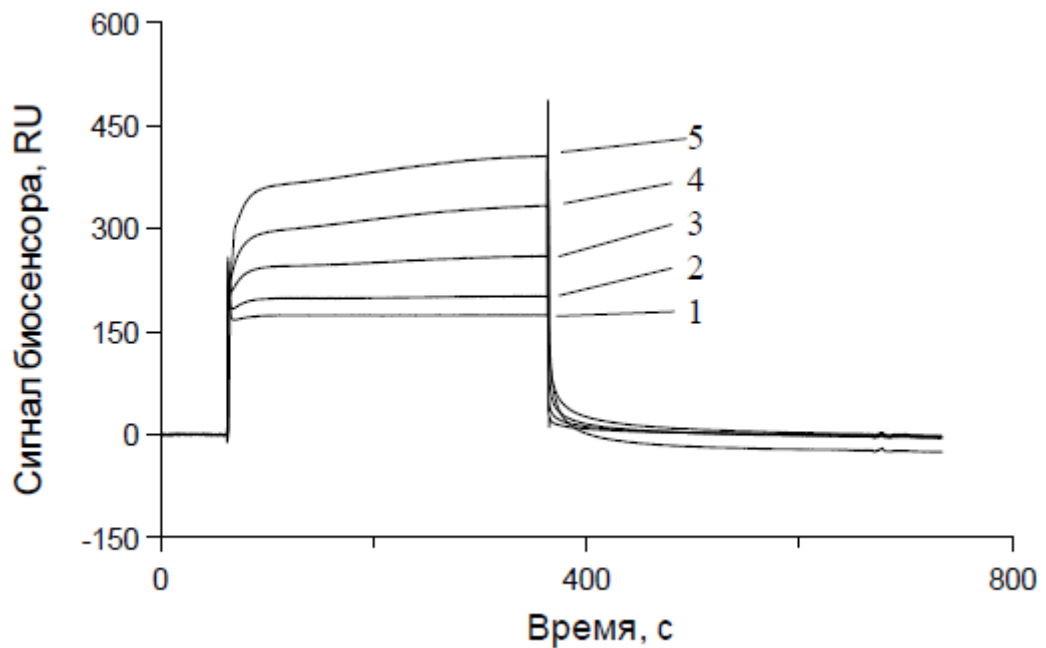


Рис. 42. Сенсограммы взаимодействия кетоконазола в концентрациях 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ(3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5) с CYP51A1 при 25°C.

Путём обработки экспериментальных кривых были получены значения равновесных констант диссоциации комплексов низкомолекулярных соединений с иммобилизованным CYP51A1. Данные представлены в таблице 2.

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

С помощью спектрального титрования соединения, показавшие способность в концентрации 30 мкМ взаимодействовать с CYP51 человека с уровнем сигнала биосенсора большим или равным 15 RU, были проанализированы на способность связываться в активном центре этого фермента и влиять на спиновое состояние атома железа гема. Положительные результаты были получены для капсикозина, голотурина 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 ± 0,32	5,75 ± 0,49*
3	Аспарагозид С	ND	ND
5	Томатозид	14,90 ± 2,38	ND
7	Г-гитонин	62,00 ± 10,54	ND
8	Функиозид Н	24,10 ± 3,37	ND
9	Капсикозид А	6,67 ± 1,27	ND
10	Протополигонатозид G	ND	ND
11	Томатонин	ND	ND
12	Капсикозин	18,70 ± 3,37	2,42 ± 0,72
13	Функиозид F	0,27 ± 0,05	ND

№ соединения	Соединение	K _D комплекса с CYP51A1, мкМ	
		Биосенсор	Спектральное титрование
18	Ацетат β-ситостерина	118,00 ± 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	ТА	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 [19].

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.

5.6. Биохимическое тестирование ингибирующего действия низкомолекулярных соединений на CYP51A1.

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 данного 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 будут 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 IC_{50} не ставилась, однако, этот параметр можно оценить для этих соединений как находящийся в диапазоне 10^{-5} – 10^{-6} М.

По результатам биохимического тестирования среди изученных соединений голотурин А показал большую способность ингибировать активность CYP51A1, а бетулафолиентриол, теасапонин, HD-1 и HD-2 обладали менее выраженным ингибирующим эффектом.

5.7. Анализ термодинамических параметров взаимодействия

низкомолекулярных соединений с иммобилизованным CYP51A1.

Были получены сенсограммы взаимодействия с иммобилизованным CYP51A1 5 соединений, снижающих активность CYP51A1, а также кетоконазола, известного ингибитора CYP51A1 ($IC_{50} = 0,43$ мкМ [232]), и ланостерола, естественного субстрата CYP51A1, 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. Также был проведён термодинамический анализ взаимодействия CYP51A1 и его естественного субстрата – ланостерола.

На рис 43-51 приведены сенсограммы взаимодействия низкомолекулярных

соединений с CYP51A1 при температурах от 10 до 40 °C при концентрации 50 мкМ.

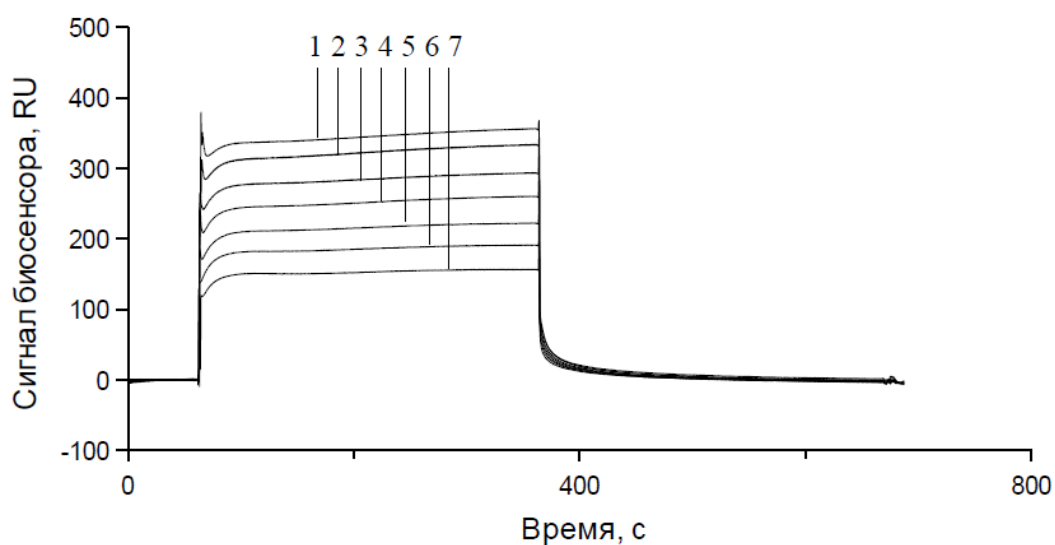


Рис. 43. Сенсограммы взаимодействия кетоконазола в концентрации 50 мкМ с CYP51A1 при температурах 10 (1), 15 (2), 20 (3), 25 (4), 30 (5), 35 (6), 40 (7) °C.

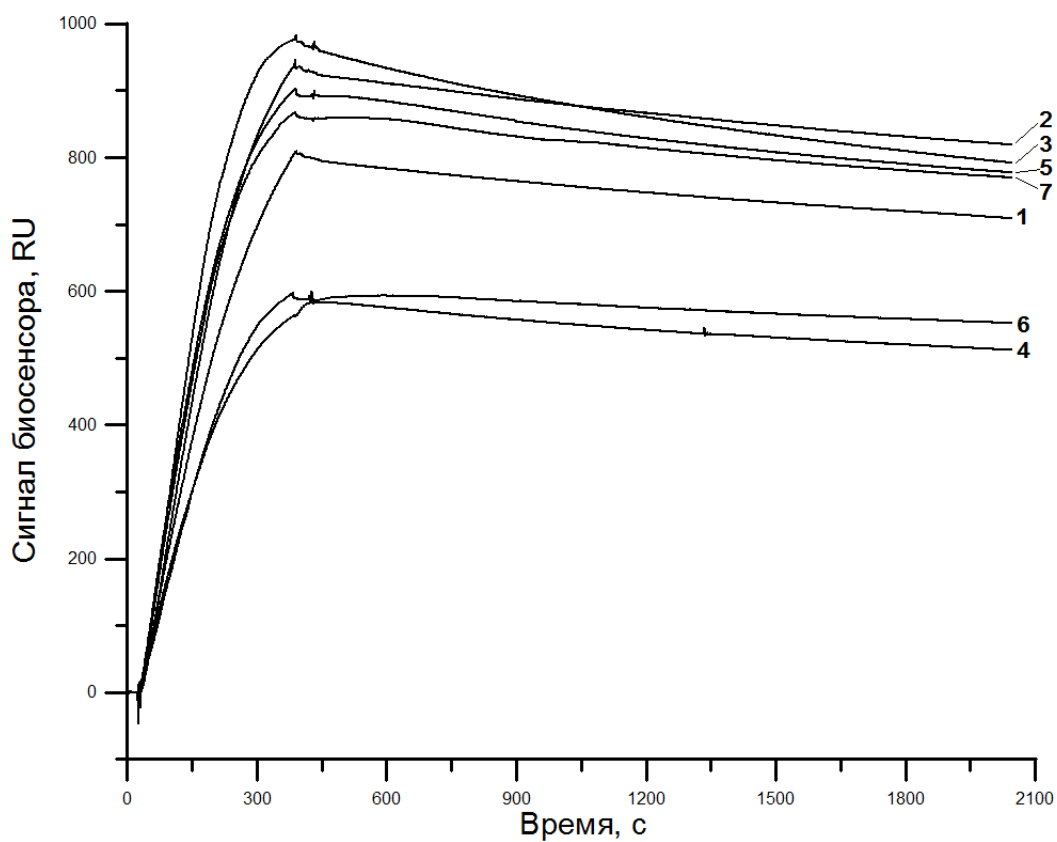


Рис. 44. Сенсограммы взаимодействия ланостерола в концентрации 50 мкМ с CYP51A1 при температурах 10 (1), 15 (2), 20 (3), 25 (4), 30 (5), 35 (6), 40 (7) °C.

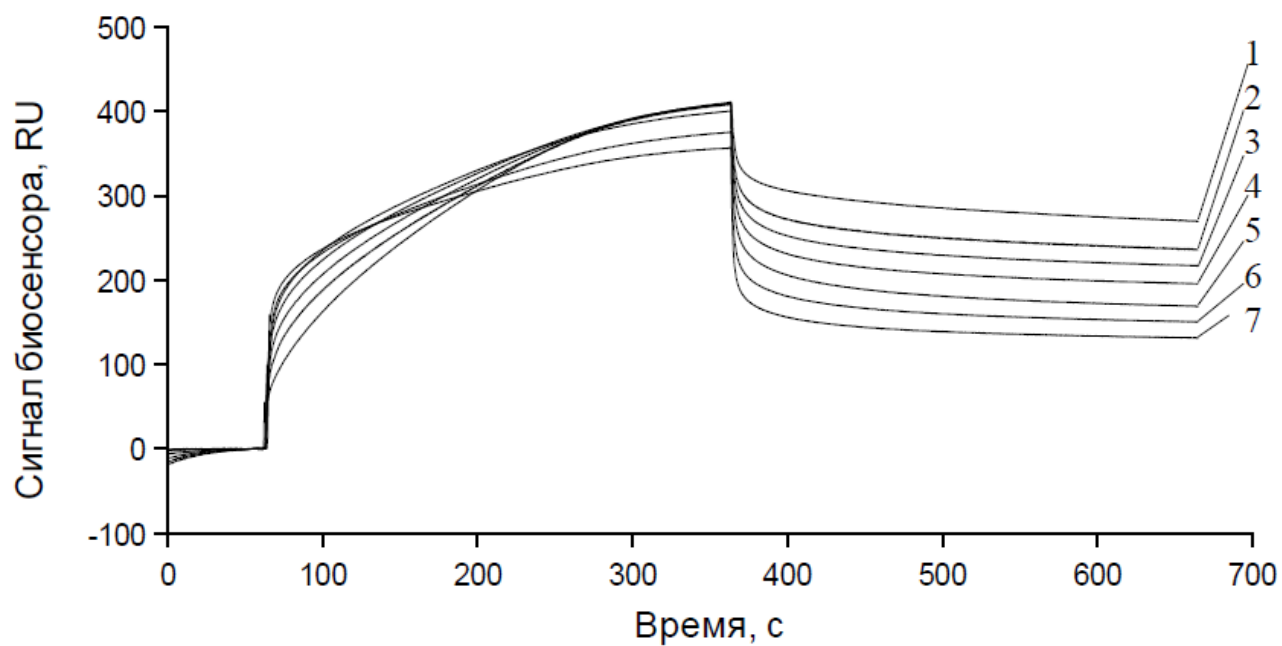


Рис. 45. Сенсограммы взаимодействия теасапонина в концентрации 50 мкМ с CYP51A1 при температурах 10 (1), 15 (2), 20 (3), 25 (4), 30 (5), 35 (6), 40 (7) °С.

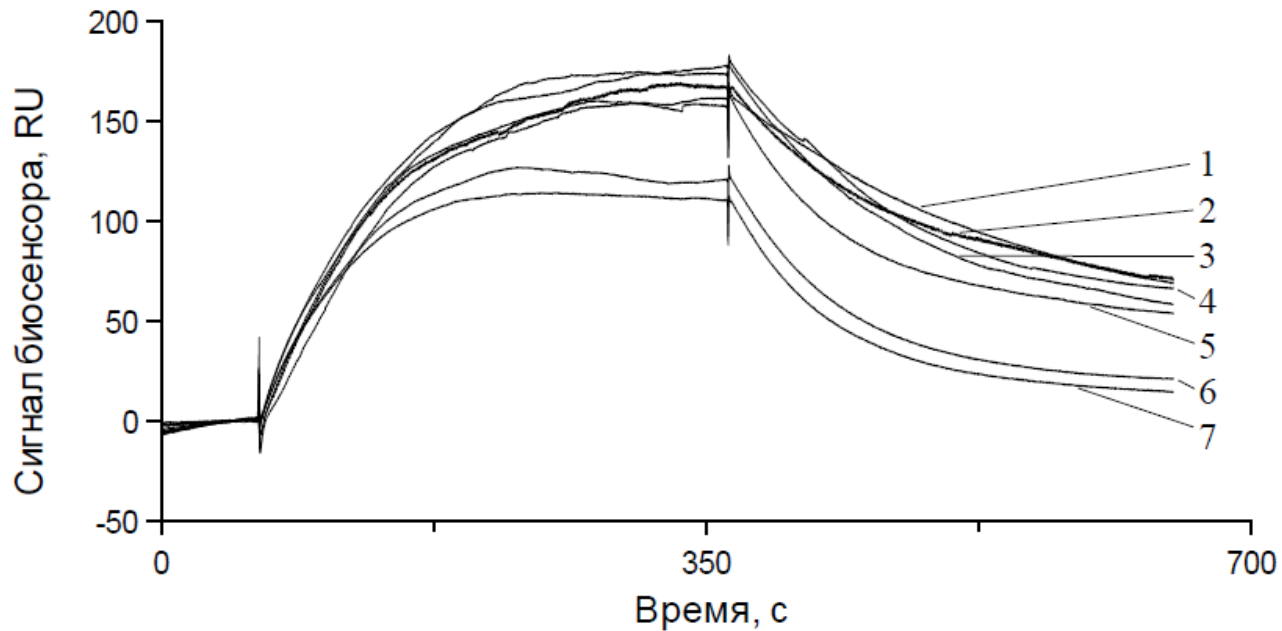


Рис. 46. Сенсограммы взаимодействия бетулафолиентриола в концентрации 50 мкМ с CYP51A1 при температурах 10 (1), 15 (2), 20 (3), 25 (4), 30 (5), 35 (6), 40 (7) °С.

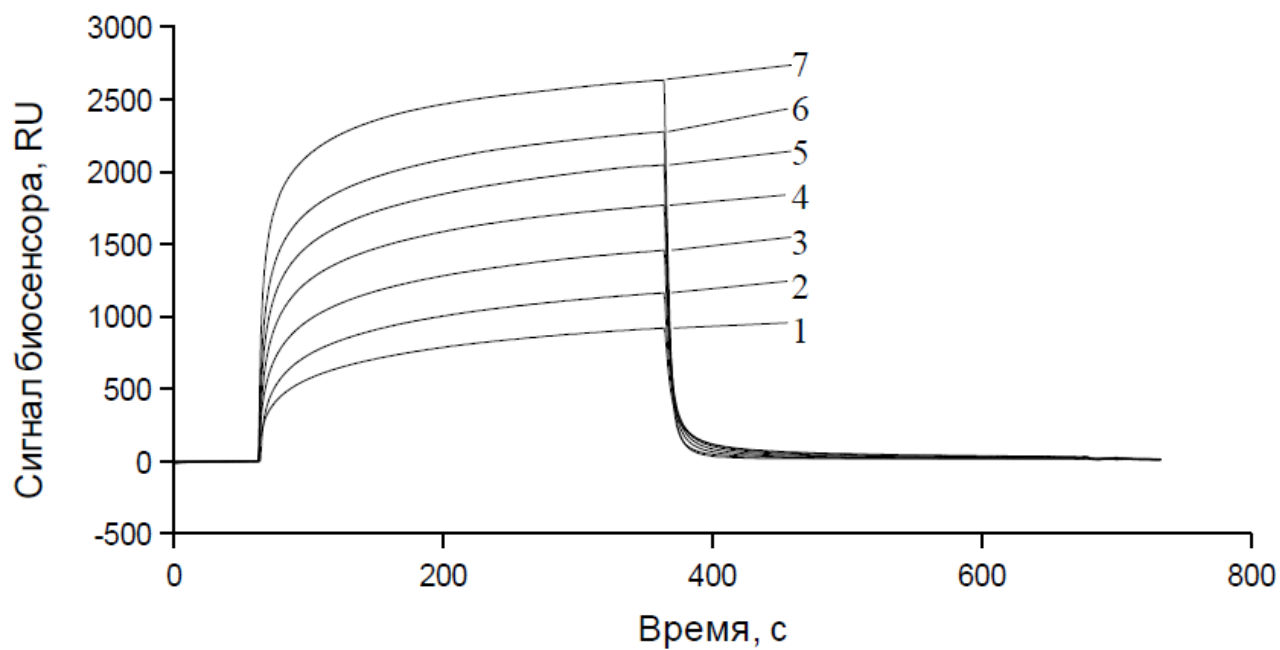


Рис. 47. Сенсограммы взаимодействия голотурина А в концентрации 50 мкМ с CYP51A1 при температурах 10 (1), 15 (2), 20 (3), 25 (4), 30 (5), 35 (6), 40 (7) °С.

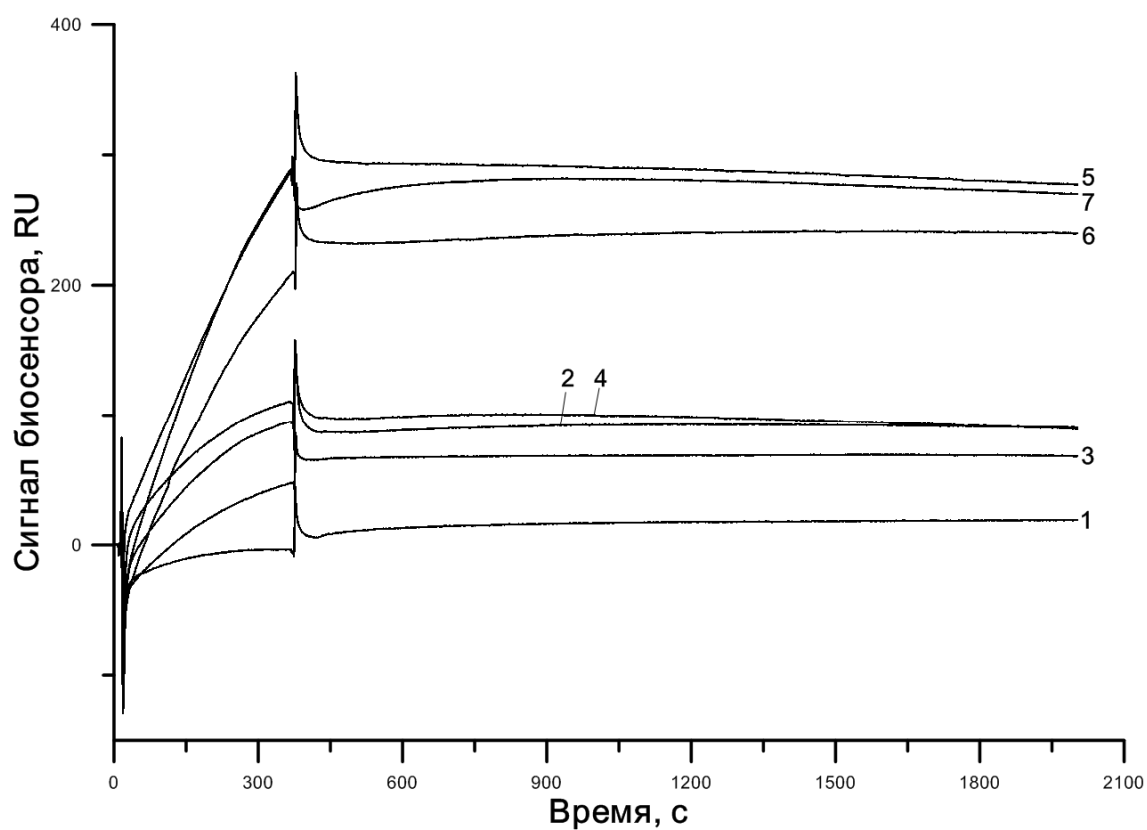


Рис. 48. Сенсограммы взаимодействия HD-1 в концентрации 50 мкМ с CYP51A1 при температурах 10 (1), 15 (2), 20 (3), 25 (4), 30 (5), 35 (6), 40 (7) °С.

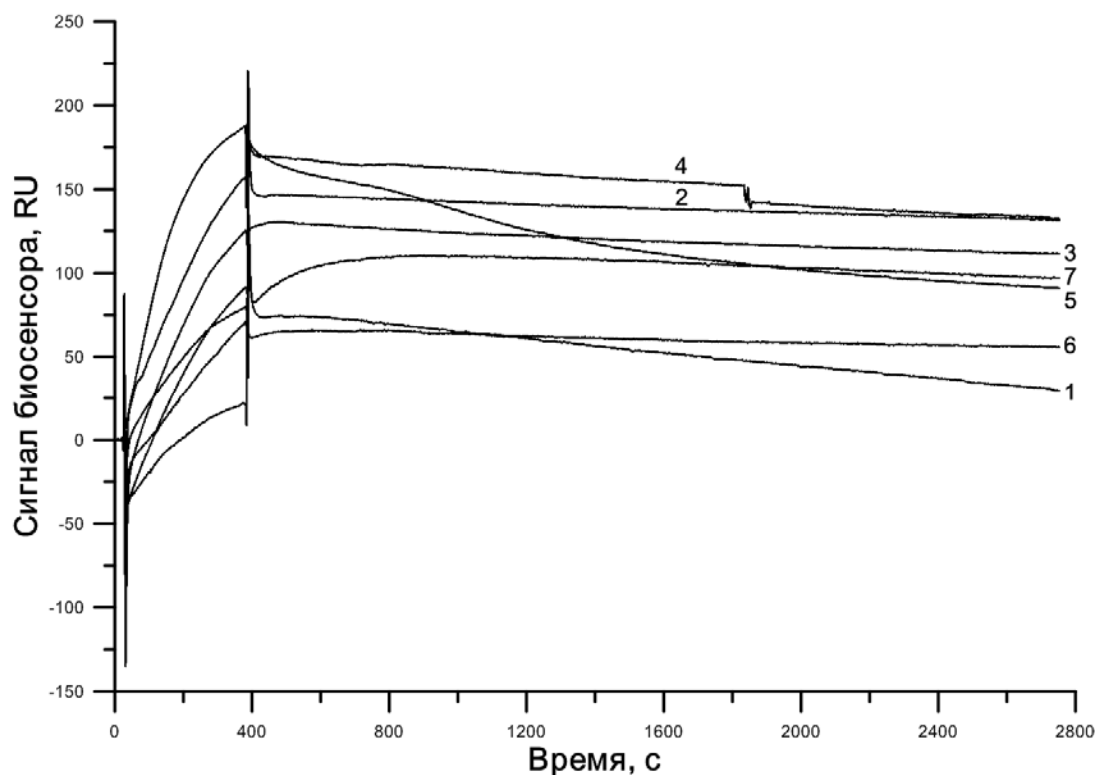


Рис. 49. Сенсограммы взаимодействия HD-2 в концентрации 50 мкМ с CYP51A1 при температурах 10 (1), 15 (2), 20 (3), 25 (4), 30 (5), 35 (6), 40 (7) °C.

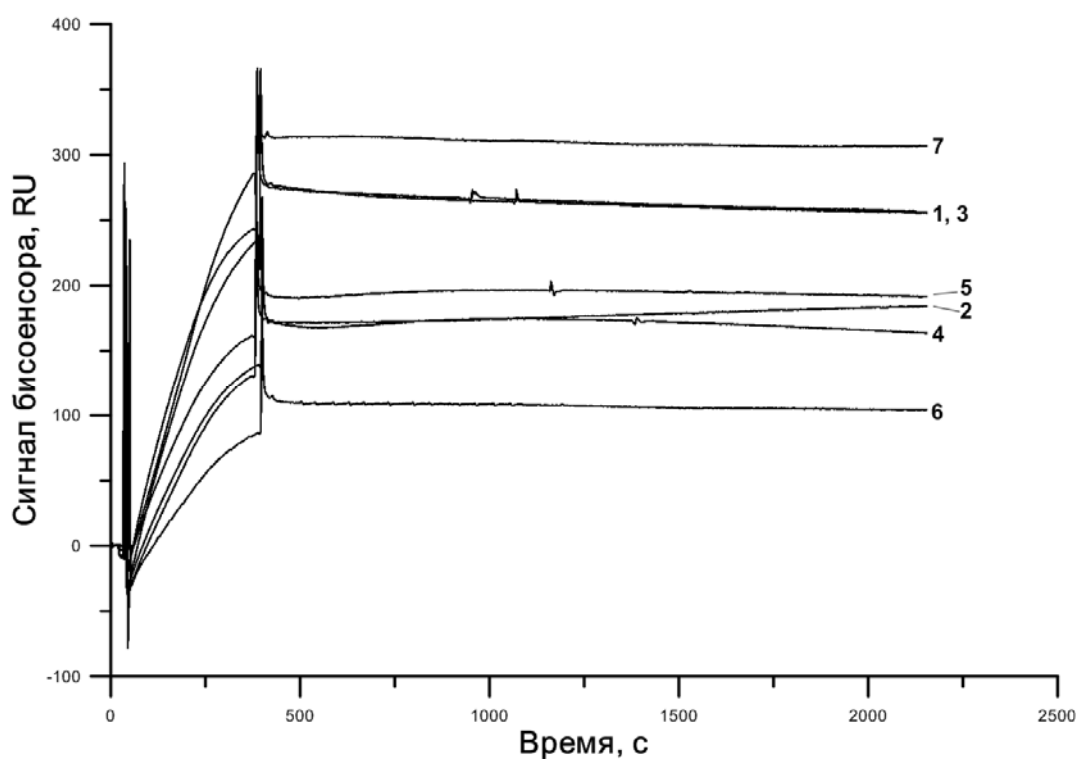


Рис. 50. Сенсограммы взаимодействия PP1 в концентрации 50 мкМ с CYP51A1 при температурах 10 (1), 15 (2), 20 (3), 25 (4), 30 (5), 35 (6), 40 (7) °C.

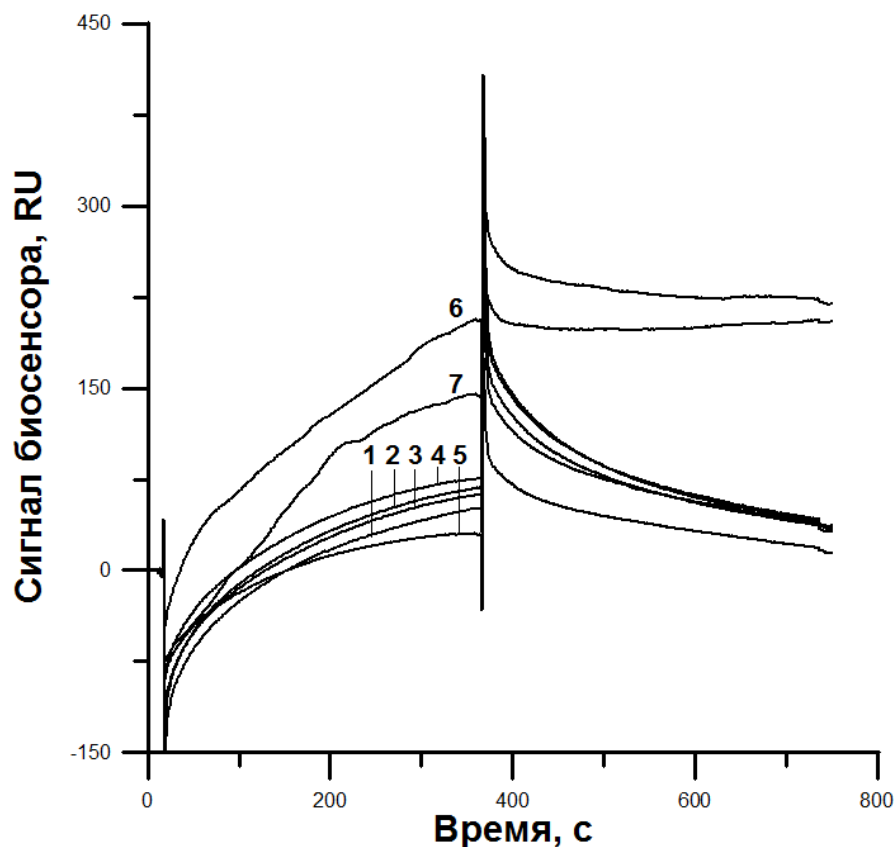


Рис. 51. Сенсограммы взаимодействия дигитонина в концентрации 50 мкМ с CYP51A1 при температурах 10 (1), 15 (2), 20 (3), 25 (4), 30 (5), 35 (6), 40 (7) °С.

Путём обработки экспериментальных кривых были получены значения равновесных констант диссоциации комплексов низкомолекулярных лигандов с иммобилизованным CYP51A1 в диапазоне температур 10 – 40 °С.

На рисунках 52, 53 приведены температурные зависимости $\ln K_D$ от обратной температуры для голотурина А, бетулафолиентриола, теасапонина, HD-1, HD-2 отобранных в результате биосенсорного и биохимического тестирования, а также кетоконазола. Кроме того, приведены аналогичные графики для дигитонина и PP1.

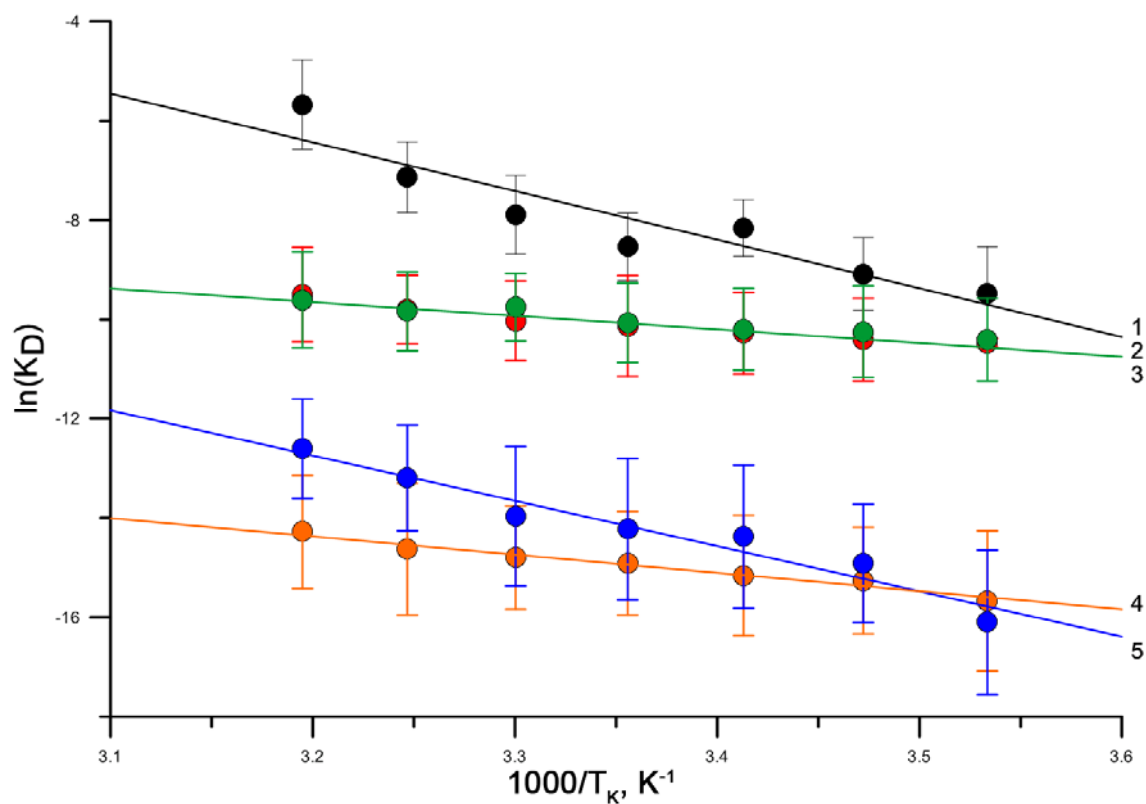


Рис. 52. Температурные зависимости $\ln K_D$ для теасапонина (1) и бетулафолиентриола (2), дигитонина (3), HD-1 (4), HD-2 (5).

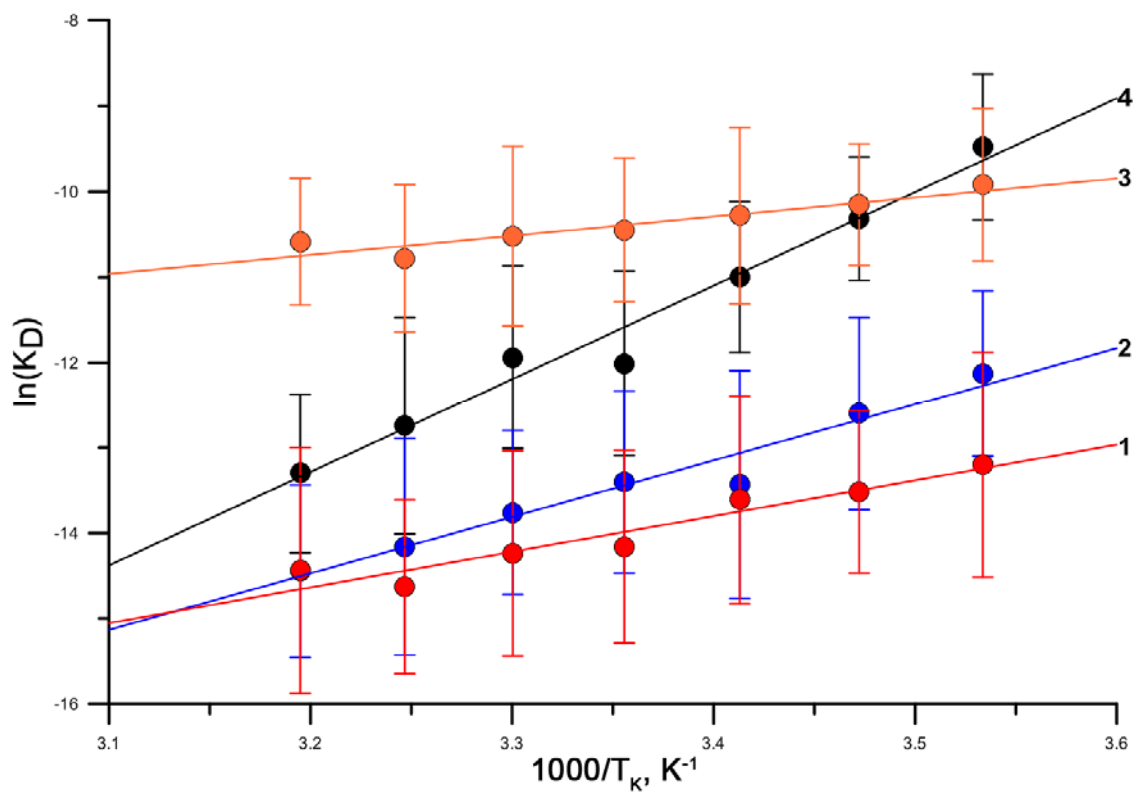


Рис. 53. Температурные зависимости $\ln K_D$ для ланостерола (1), PP1 (2), голотурина А (3), кетоконазола (4).

В таблице 4 и на рисунке 54 приведены среднеарифметические значения расчётов энтальпии и энтропии и среднеквадратичные отклонения этих значений, полученные из 3-х независимых экспериментов, для формирования и распада комплексов CYP51A1 с низкомолекулярными соединениями.

Таб. 4. Термодинамические параметры взаимодействия низкомолекулярных соединений с CYP51A1 при 298 К.

№ соединения	Соединение	ΔG , ккал/моль	ΔH , ккал/моль	$-T\Delta S$, ккал/моль	ΔS , кал/моль·К	K_D , мкМ
1	Ланостерол	$-8,8 \pm 0,9$	$8,0 \pm 1,2$	$-16,4 \pm 2,5$	$54,9 \pm 7,1$	$2,10 \pm 0,32$
26	Голотурин А	$-6,2 \pm 0,6$	$4,4 \pm 0,4$	$-10,6 \pm 1,0$	$35,6 \pm 3,3$	$19,50 \pm 3,71$
27	Дигитонин	$-6,0 \pm 0,9$	$-4,5 \pm 0,5$	$-1,5 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,9$	$27,00 \pm 4,59$
29	Бетулафолин-триол	$-6,0 \pm 0,7$	$-9,8 \pm 0,4$	$3,8 \pm 1,1$	$-12,6 \pm 3,8$	$7,00 \pm 1,26$
34	Теасапонин	$-5,0 \pm 0,6$	$-14,5 \pm 1,0$	$9,5 \pm 1,6$	$-31,6 \pm 5,6$	$140,00 \pm 25,20$
44	HD-1	$-8,8 \pm 1,2$	$-7,7 \pm 1,0$	$-1,1 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,6$	$0,34 \pm 0,06$
45	HD-2	$-8,4 \pm 0,9$	$-17,0 \pm 2,6$	$8,6 \pm 1,3$	$-28,8 \pm 3,8$	$0,65 \pm 0,11$
46	PP1	$-7,9 \pm 1,2$	$12,4 \pm 1,6$	$-20,3 \pm 2,2$	$68,1 \pm 12,3$	$1,52 \pm 0,29$
51	Кетоконазол	$-7,1 \pm 0,8$	$22,1 \pm 2,2$	$-29,2 \pm 3,0$	$97,8 \pm 10,7$	$6,10 \pm 0,50$

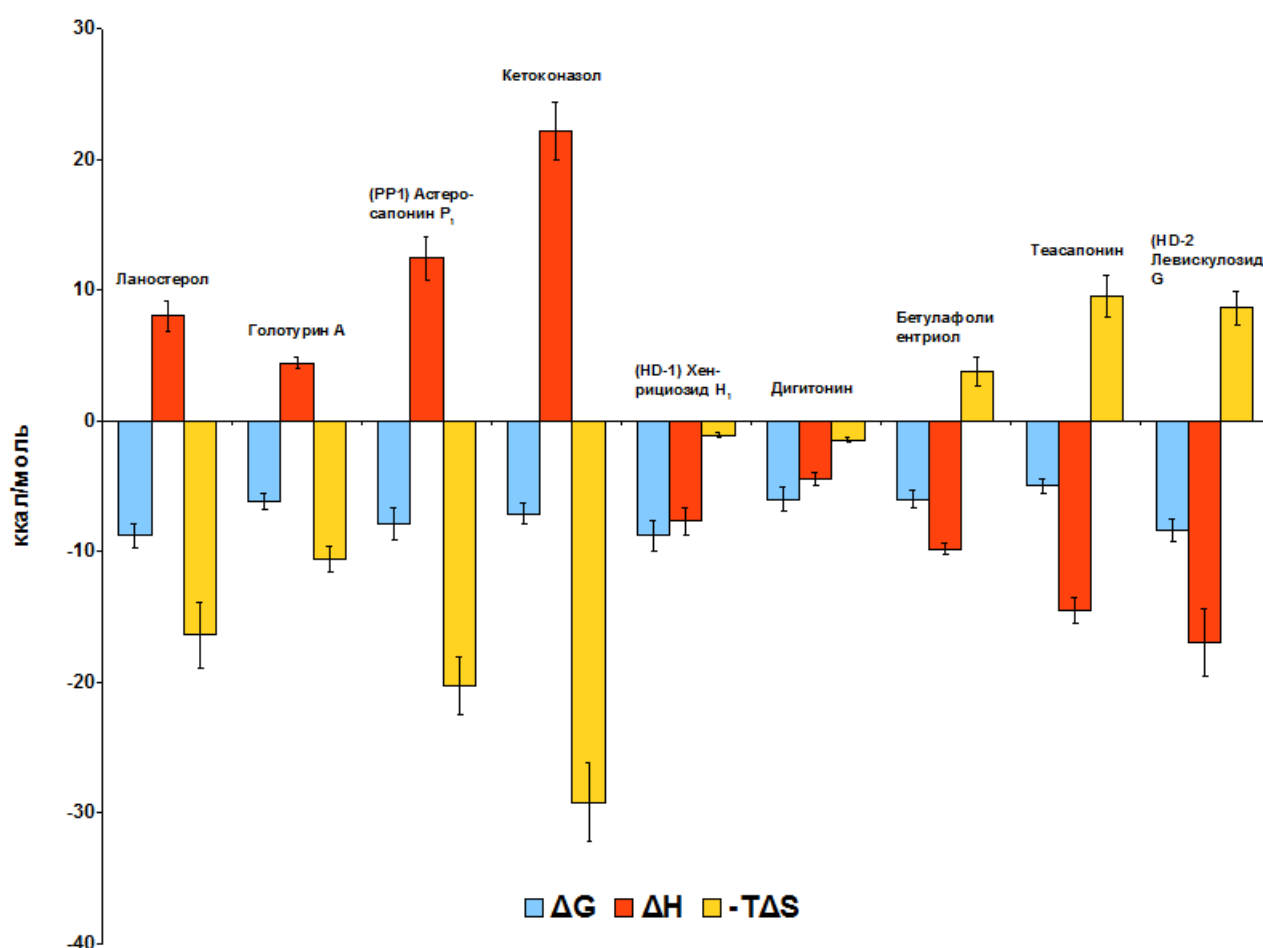


Рис. 54. Термодинамические параметры взаимодействия низкомолекулярных соединений с CYP51A1 при 298 К.

Как видно из таблицы 4 и рисунка 54, было показано распределение низкомолекулярных соединений на три группы согласно соотношению термодинамических параметров взаимодействий этих соединений с CYP51A1. Для ланостерола голотурина А, PP1 наблюдалось положительное изменение энтальпии (реакция эндотермическая) и энтропии в ходе взаимодействия, что выражено отрицательным значением параметра $-T\Delta S$. Для теасапонина, бетулафолиентриола, HD-2 было показано отрицательное изменение энтальпии (реакция экзотермическая) и отрицательное изменение энтропии, что выражается положительным значением параметра $-T\Delta S$. Для дигитонина и HD-1 наблюдалось 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 теасапонины, бетулафолиентриола и HD-2 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. Причём, распределение по группам не коррелирует с химической структурой соединений и их способностью ингибировать активность CYP51A1.

5.8. 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 (по методике, аналогичной пункту 4.4.2). В результате было получено, что таковым является 10 mM ацетатный буфер с pH 5,0. Средний уровень иммобилизации CYP51 *Candida albicans* составил 15000 RU. 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. Результаты представлены на рисунке 55.

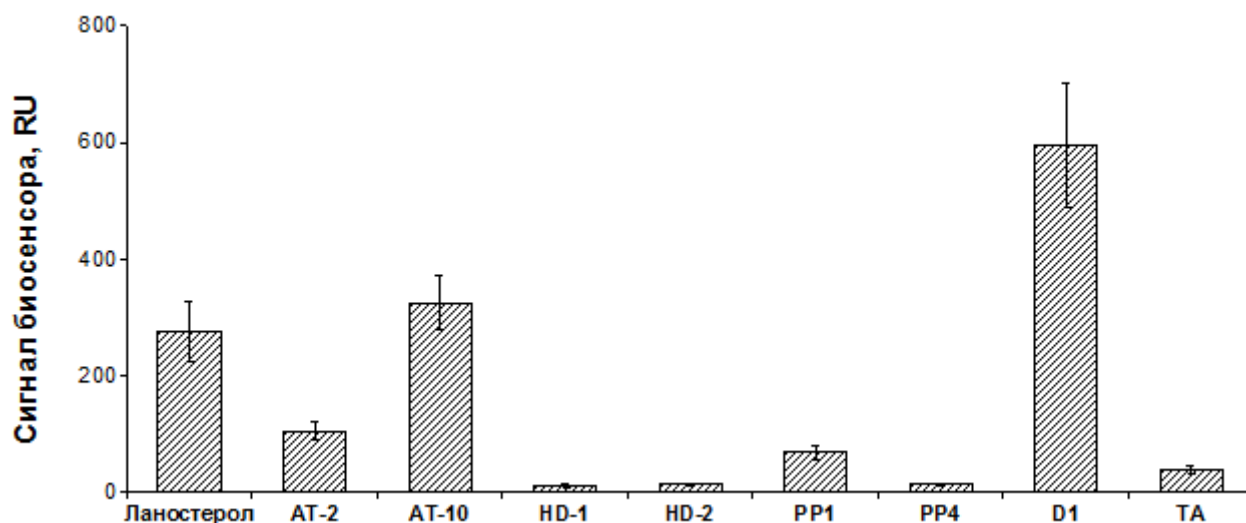


Рис. 55. Анализ способности низкомолекулярных соединений взаимодействовать с CYP51 *Candida albicans*. Концентрация соединений 30 мкМ. Уровень иммобилизации белка – 15000 RU.

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 56.

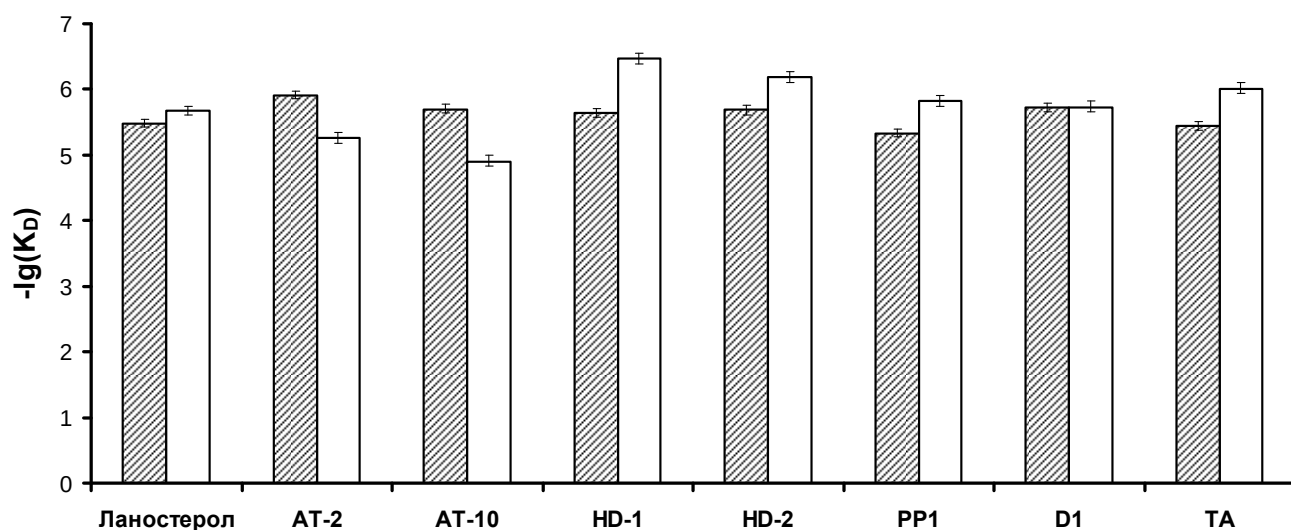


Рис. 56. Сравнение K_D комплексов низкомолекулярных соединений с CYP51 человека ($\square$) и *Candida albicans* (штриховка), полученных методом SPR.

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 TA 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, 49, 50) 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, не смотря на достаточно консервативную структуру их активных центров.

Результаты биосенсорных и спектрофотометрических экспериментов представлены в таблице 5.

Таб. 5. 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

ND – зафиксировать значимые параметры взаимодействия не удалось.

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 Иголокожие 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*.

6. Заключение

В нашем исследовании была предложена методика работы с рекомбинантным белком CYP51A1 для поиска новых ингибиторов этого белка соединением методом поверхностного плазмонного резонанса, спектрального титрования и биохимического тестирования. Было показано, что тест-система на основе оптического биосенсора позволяет проводить исследования как с соединениями, аналогами субстрата, так и азольными препаратами. Из тестовой выборки 58 низкомолекулярных соединений было отобрано 32 соединения, удовлетворивших принципиальным критериям для дальнейшего изучения, включая два положительных контроля: ланостерол как естественный субстрат CYP51A1 и кетоконазол как представитель класса азолов.

Среди 32 соединений, прошедших первичный анализ на способность взаимодействовать с CYP51A1, для 29 были определены равновесные константы диссоциации комплексов с данным белком. Все прошедшие скрининг соединения, за исключением кетоконазола, содержали стероид-подобный структурный элемент с различными заместителями. Из 8 азольных соединений, представленных в тестовой выборке, взаимодействие с CYP51A1 было показано только для кетоконазола. Методом спектрального титрования было показано, что 9 из 29 прошедших скрининг соединений способны взаимодействовать с активным центром фермента (включая ланостерол и кетоконазол). Для 7 соединений, взаимодействие которых с CYP51A1 ранее не изучалось, был проведён биохимический анализ на способность ингибировать активность CYP51A1. Было обнаружено, что голотурин А, бетулафолиентриол, теасапонин, хенрициозид Н₁, левискулозид G обладают такой способностью, и для этих соединений, а также для дигитонина и астеросапонина Р₁ были определены термодинамические параметры взаимодействия с CYP51A1. Показано разделение распределения термодинамических параметров на три группы: энтальпийно-, энтропийно- и энтальпийно-энтропийно-зависимые взаимодействия.

На примере штамма CYP51 *Candida albicans*, несущего три выявленные в клинике мутации, отвечающие за резистентность к азолам, было показано, что предложенная нами методика применима к другим белкам этого семейства. Обнаружено три соединения, которые способны взаимодействовать с активным центром CYP51 *Candida albicans* и могут гипотетически являться конкурентными ингибиторами данного белка.

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

7. 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 Р₁) 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 астеросапонин Р₁), (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.

8. Благодарности.

Автор выражает огромную благодарность:

Научному руководителю – д.б.н., профессору Иванову А.С. за неоценимую помощь в подготовке диссертационной работы.

Сотрудникам Государственного научного учреждения «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» города Минск республики Беларусь: академику Усанову С.А., к.х.н. Гилепу А.А., к.х.н. Струшкевич Н.В., к.х.н. Янцевичу А.В., Грибовец И.П., Шкель Т.В. – за помощь в выполнении многих экспериментальных задач.

Сотрудникам Федерального государственного бюджетного учреждения Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук города Владивостока: академику Стонику В.А., д.х.н. Киче А.А., к.х.н. Иванчиной Н.В. – за предоставленные образцы низкомолекулярных соединений.

Профессору Kintya P. из The Institute of Genetics and Plant Physiology of the Academy of Sciences of Moldova города Chisinau республики Молдова – за предоставленные образцы низкомолекулярных соединений.

Сотрудникам лаборатории межмолекулярных взаимодействий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»: к.б.н. Гнеденко О.В., к.б.н. Ершову П.В. – за помощь в подготовке диссертационной работы.

9. Список литературы.

1. Ortiz de Montellano, P.R. Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry / Springer. 2005.
2. Nes, W.R., McKean. M.R. Biochemistry of Steroids and Other Isopentenoids / University Park Press. Baltimore. 1977.
3. Pikuleva I.A. Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis // *Pharmacology & Therapeutics*. 2006. V.112(3). P.761-773.
4. Демографический ежегодник России / Росстат. – М. 2013.
5. Российский статистический ежегодник. 2013 / Росстат. – М. 2013.
6. Ступаков И.Н., Гудкова Р.Г. Смертность от ишемической болезни сердца в Российской Федерации // *Здравоохранение*. 2008. Т.7. P.21-34.
7. Смирнов А.А. Сравнительный анализ клинической эффективности современных статинов // *Лечащий врач*. 1999. Т.9(99).
8. Taylor F., Ward K., Moore T.H., Burke M., Davey Smith G., Casas J.P., Ebrahim S. Statins for the primary prevention of cardiovascular disease // *Cochrane Database Syst Rev*. 2011. V.19(1). CD004816.
9. Ivanov A.S., Gnedenko O.V., Molnar A.A., Veselovsky A.V., Shatinina S.Z., Usanov S.A., Archakov A.I. SPR screening of potential ligands for human CYP51 // 5-th International Conference “Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnology for Medicine”, St.Petersburg-Kizhi-Mandrogry-Valaam-Konevets-St.Petersburg. 2010.
10. Trzaskos J.M., Fischer R.T., Favata M.F. Mechanistic studies of lanosterol C-32 demethylation. Conditions which promote oxysterol intermediate accumulation during the demethylation process // *J. Biol. Chem*. 1986. V.261. P.16937–16942.
11. Galli-Kienle M., Anastasia M., Cighetti G., Galli G., Fiecchi A. Studies on the 14 alpha-demethylation mechanism in cholesterol biosynthesis // *Eur. J. Biochem* 1980. V.110. P.93–105.
12. Yoshida Y., Aoyama Y. Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14 alpha-

- demethylation. I. Purification and spectral properties // J. Biol. Chem. 1984. V.259. P.1655–1660.
13. Kalb V.F., Loper J.C., Dey C.R. Isolation of a cytochrome P-450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae* // Gene. 1986. V.45. P.237–245.
 14. Nebert D.W., Nelson D.R., Coon M.J., Estabrook R.W., Feyereisen R., Fujii-Kuriyama Y., Gonzalez F.J., Guengerich F.P., Gunsalus I.C., Johnson E.F., et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature // DNA Cell. Biol. 1991. V.10. P.1–14.
 15. Trzaskos J., Kawata S., Gaylor J.L. Microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis. Purification of lanosterol 14 alpha-methyl demethylase cytochrome P-450 from hepatic microsomes // J. Biol. Chem. 1986. V.261. P.14651–14657.
 16. Kahn R.A., Bak S., Olsen C.E., Svendsen I., Moller B.L. Isolation and reconstitution of the heme-thiolate protein obtusifoliosol 14alpha-demethylase from *Sorghum bicolor* (L.) Moench // J. Biol. Chem. 1996. V.271. P.32944–32950.
 17. Bellamine A., Mangla A.T., Nes W.D., Waterman M.R. Characterization and catalytic properties of the sterol 14alpha-demethylase from *Mycobacterium tuberculosis* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999. V.96. P.8937–8942.
 18. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Archakov A.I. Electrochemistry of cytochromes p450: analysis of current-voltage characteristics of electrodes with immobilized cytochromes p450 for the screening of substrates and inhibitors // Biochemistry (Mosc). 2009. V.74(4). P.438–44.
 19. Strushkevich N., Usanov S.A., Park H.-W., Structural basis of human CYP51 inhibition by antifungal azoles // J. Mol. Biol. 2010. V.397. P.1067–1078.
 20. Mitropoulos K.A., Gibbons G.F., Reeves B.E. Lanosterol 14alpha-demethylase. Similarity of the enzyme system from yeast and rat liver // Steroids. 1976. V.6. P.821–829.
 21. <http://www.uniprot.org>.
 22. Kim H.B., Schaller H., Goh C.H., Kwon M., Choe S., An C.S., Durst F., Feldmann K.A., Feyereisen R. *Arabidopsis* cyp51 mutant shows postembryonic

- seedling lethality associated with lack of membrane integrity // *Plant Physiol.* 2005. V.138. P.2033–2047.
23. Lepesheva G.I., Waterman M.R. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V.1770(3). P.467–477.
 24. Waterman M.R., Lepesheva G.I. Sterol 14 α -demethylase, an abundant and essential mixedfunction oxidase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V.338. P.418–422.
 25. Yoshida Y. Sterol biosynthesis. In: Omura, T., Oshimura, Y., Fujii-Kuriyama, Y., editors. *Cytochrome P450*. 2nd Ed. / Tokyo Kodansha. 1992. P.93-101.
 26. Shyadehi A.Z., Lamb D.C., Kelly S.L., Kelly D.E., Schunck W.H., Wright J.N., Corina D., Akhtar M. The mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombinant sterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* (other names are: lanosterol 14 α -demethylase, P-45014DM, and CYP51) // *J. Biol. Chem.* 1996. V.271. P.12445–12450.
 27. Berriman M., Ghedin E., Hertz-Fowler C., et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei* // *Science.* 2005. V.309. P.416–422.
 28. Pena-Diaz J., Montalvetti A., Flores C.L., Constan A., Hurtado-Guerrero R., De Souza W., Gancedo C., Ruiz-Perez L.M., Gonzalez-Pacanowska D. Mitochondrial localization of the mevalonate pathway enzyme 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in the *Trypanosomatidae* // *Mol. Biol. Cell.* 2004. V.15. P.1356–1363.
 29. Paila Y.D., Chattopadhyay A., Membrane cholesterol in the function and organization of G-Protein coupled receptors // *Subcellular Biochemistry.* 2010. V.51. P.439-466.
 30. Burton P.M., Swinney D.C., Heller R., Dunlap B., Chiou M., Malonzo E., Haller J., Walker K.M., Salari A., Murakami S., Mendizabal G., Azalanstat L.T. Azalanstat (RS-21607), a lanosterol 14 α -demethylase inhibitor with cholesterol-lowering activity // *Biochem. Pharmacol.* 1995. V.50. P.529–544.

31. Lepesheva G.I., Nes W.D., Zhou W., Hill G.C., Waterman M.R. CYP51 from *Trypanosoma brucei* is obtusifoliol-specific // *Biochemistry*. 2004. V.43. P.10789–10799.
32. Cotman M., Jezek D., Fon Tacer K., Frangez R., Rozman D. A functional cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase CYP51 enzyme in the acrosome: transport through the Golgi and synthesis of meiosis-activating sterols // *Endocrinology*. 2004. V.145. P.1419–1426.
33. Stromstedt M., Waterman M.R., Haugen T.B., Tasken K., Parvinen M., Rozman D. Elevated expression of lanosterol 14 α -demethylase (CYP51) and the synthesis of oocyte meiosis-activating sterols in postmeiotic germ cells of male rats // *Endocrinology*. 1998. V.139. P.2314–2121.
34. Ivanov A.S., Gnedenko O.V., Molnar A.A., Archakov A.I., Podust L.M. FMN binding site of yeast NADPH-cytochrome P450 reductase exposed at the surface is highly specific // *ACS Chem Biol*. 2010 Aug 20. V.5(8). P.767-76.
35. Lepesheva G.I., Virus C., Waterman M.R. Conservation in the CYP51 family. Role of the B' helix/BC loop and helices F and G in enzymatic function // *Biochemistry*. 2003. V.42. P.9091–9101.
36. Lepesheva G.I., Waterman M.R. CYP51 – the omnipotent P450 // *Mol. Cell. Endocrinol*. 2004. V.215. P.165–170.
37. Лисица А.В., Гусев С.А., Мирошниченко Ю.В., Кузнецова Г.П., Лазарев В.Н., Скворцов В.С., Карузина И.И., Говорун В.М., Арчаков А.И. Структурно-функциональные мотивы стероловых 14-альфа-деметираз (CYP51) // *Биомедицинская Химия*. 2004. Т.50(6). С.554-566.
38. Yoshida Y., Aoyama Y., Noshiro M., Gotoh O. Sterol 14-demethylase P450 (CYP51) provides a breakthrough for the discussion on the evolution of cytochrome P450 gene superfamily // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2000. V.273. P.799–804.
39. Nitahara Y., Kishimoto K., Yabusaki Y., Gotoh O., Yoshida Y., Horiuchi T., Aoyama Y. The amino acid residues affecting the activity andazole susceptibility

- of rat CYP51 (sterol 14-demethylase P450) // J. Biochem. (Tokyo). 2001. V.129. P.761–768.
40. Lepesheva G.I., Zaitseva N.G., Nes W.D., Zhou W., Arase M., Liu J., Hill G.C., Waterman M.R. CYP51 from *Trypanosoma cruzi*: a phyla-specific residue in the B' helix defines substrate preferences of sterol 14 α -demethylase // J. Biol. Chem. 2006. V.281. P.3577–3585.
 41. Bellamine A., Lepesheva G.I., Waterman M.R. Fluconazole binding and sterol demethylation in three CYP51 isoforms indicate differences in active site topology // J. Lipid Res. 2004. V.45. P.2000–2007.
 42. Podust L.M., Poulos T.L., Waterman M.R. Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V.98. P.3068–3073.
 43. Aoyama Y. Recent progress in the CYP51 research focusing on its unique evolutionary and functional characteristics as a diversozyme P450 // Front. Biosci. 2005. V.10. P.1546–1557.
 44. Raag R., Martinis S.A., Sligar S.G., Poulos T.L. Crystal structure of the cytochrome P-450CAM active site mutant Thr252Ala // Biochemistry. 1991. V.48. P.11420–11429.
 45. Vidakovic M., Sligar S.G., Li H., Poulos T.L. Understanding the role of the essential Asp251 in cytochrome p450cam using site-directed mutagenesis, crystallography, and kinetic solvent isotope effect // Biochemistry. 1998. V.26. P.9211–9219.
 46. Ефремова О.А. Атеросклероз. Современные представления и принципы лечения. Рекомендации ВНОК. // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. Белгородский государственный университет. 2009. Т.12(67). С.84-96.
 47. Worner M., Melchior K., Monostory K., Pascussi J.M., Huber C.G., Bernhardt R. The effects of rosuvastatin and the CYP51A1 inhibitor LEK-935 on the proteome

- of primary human hepatocytes // *Drug. Metab. Dispos.* 2012. V.40(3). P.414-8.
48. Monostory K., Pascussi J.M., Szabo P., Temesvári M., Köhalmi K., Acimovic J., Kocjan D., Kuzman D., Wilzewski B., Bernhardt R., Kobori L., Rozman D. Drug interaction potential of 2-((3,4-dichlorophenethyl)(propyl)amino)-1-(pyridin-3-yl)ethanol (LK-935), the novel nonstatin-type cholesterol-lowering agent // *Drug. Metab. Dispos.* 2009. V.37(2). P.375-85.
 49. Ерёмин А.Н., Усанов С.А., Метелица Д.И., Ахрем А.А. Спектральные параметры взаимодействия высокоочищенных форм цитохрома P-450 LM2 и LM4 с различными лигандами // *Биоорганическая химия.* 1980. Т.6(5). С.757-764.
 50. Testa B., Jenner P. Inhibitors of cytochrome P-450s and their mechanism of action // *Drug. Metab. Rev.* 1981. V.12. P.1-117.
 51. Correia M.A., Ortiz de Montellano P.R. Inhibitors of cytochrome P450 and possibilities for their therapeutic application. In K. Ruckpaul (ed.), *Frontiers in Biotransformation.* /Akademie-Verlag. Berlin. 1993. P.74-146.
 52. Murray M., Reidy G.F. Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P-450 by chemical agents // *Pharmacol. Rev.* 1990. V.42. P.85-101.
 53. Ortiz de Montellano P.R. Suicide substrates for drug metabolizing enzymes: Mechanism and biological consequences. In G.G. Gibson (ed.). *Progress in Drug Metabolism* / Taylor and Francis. NewYork. 1988. P.99-148.
 54. Vanden Bossche H. Inhibitors of P450-dependent steroid biosynthesis: From research to medical treatment // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1992. V.43. P.1003-1021.
 55. Rendic S., Di Carlo R.J. Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors // *Drug Metab. Rev.* 1997. V.29. P.413-580.
 56. Lewis D.R. Human cytochromes P450 associated with the Phase 1 metabolism of drugs and other xenobiotics: A compilation of substrates and inhibitors of the CYP1, CYP2 and CYP3 families // *Curr. Med. Chem.* 2003. V.10. P.1955-1972.

57. Kent U.M., Juschyshyn M.I., Hollenberg P.R. Mechanism-based inactivators as probes of cytochrome P450 structure and function // *Curr. Drug Metab.* 2001. V.2. P.215-243.
58. Brueggemeier R.W. Aromatase inhibitors in breast cancer therapy // *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2002. V.2. P.181-191.
59. Sato A., Nakajima T. Dose-dependent metabolic interaction between benzene and toluene in vivo and in vitro // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1979. V.48. P.249-256.
60. Watkins P.B. Role of cytochromes P450 in drug metabolism and hepatotoxicity // *Semin. Liver Dis.* 1990. V.10. P.235-250.
61. Jefcoate C.R. Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical-difference spectroscopy // *Meth. Enzymol.* 1978. V.52. P.258-279.
62. Kumaki K., Sato M., Kon H., Nebert D.W. Correlation of type I, type II, and reverse type I difference spectra with absolute changes in spin state of hepatic microsomal cytochrome P-450 iron from five mammalian species // *J. Biol. Chem.* 1978. V.253. P.1048-1058.
63. Schenkman J.B., Sligar S.G., Cinti D.L. Substrate interactions with cytochrome P-450 // *Pharmacol. Ther.* 1981. V.12. P.43-71.
64. Sligar S.G., Cinti D.L., Gibson G.G., Schenkman J.B. Spin state control of the hepatic cytochrome P-450 redox potential // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979. V.90. P.925-932.
65. Sligar S.G., Cinti D.L., Gibson G.G., Schenkman J.B. Spin state control of the hepatic cytochrome P-450 redox potential // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979. V.90. P.925-932.
66. Kitada M., Chiba K., Kamataki T., Kitagawa H. Inhibition by cyanide of drug oxidations in rat liver microsomes // *Jpn. J. Pharmacol.* 1977. V.11. P.601-608.
67. Ho B., Castagnoli N. Trapping of metabolically generated electrophilic species with cyanide ion: Metabolism of 1-benzylpyrrolidine // *J. Med. Chem.* 1980. V.23. P.133-139.

68. Sono M., Dawson J.H. Formation of low spin complexes of ferric cytochrome P-450-CAM with anionic ligands: Spin state and ligand affinity comparison to myoglobin // J. Biol. Chem. 1982. V.151. P.5496-5502.
69. Backes W.L., Hogaboom M., Canady W.J. The true hydrophobicity of microsomal cytochrome P-450 in the rat: Size dependence of the free energy of binding of a series of hydrocarbon substrates from the aqueous phase to the enzyme and to the membrane as derived from spectral binding data // J. Biol. Chem. 1982. V.257. P.4063-4070.
70. Wink D.A., Osawa Y., Darbyshe J.E., Jones C.R., Eshenaur S.C., Nims R.W. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxidereleasing agent // Arch. Biochem. Biophys. 1993. V.300. P.115-123.
71. Khatsenko O.G., Gross S.S., Rifkind A.B., Vane J.R. Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V.90. P.11147-11151.
72. Kim Y.-M., Bergonia H.A., Miiller C., Pitt B.R., Watkins WD., and Lancaster J.R., Jr. Loss and degradation of enzyme-bound heme induced by cellular nitric oxide synthesis // J. Biol. Chem. 1995. V.110. P.5710-5713.
73. Alonso-Galicia M., Drummond H., Reddy K., Falck J., Roman R. Inhibition of 20-HETE production contributes to the vascular responses to nitric oxide // Hypertension. 1997. V.29. P.320-325.
74. Drewett J.G., Adams-Hays R.L., Ho B.Y., Hegge D.J. Nitric oxide potently inhibits the rate-limiting enzymatic step in steroidogenesis // Mol. Cell. Endocrinol. 2002. V.194. P.39-50.
75. Hanson L.K., Eaton W.A., Sligar S.G., Gunsalus I.E., Gouterman M., and Connell C.R. Origin of the anomalous Soret spectra of carboxycytochrome P450 // J. Am. Chem. Soc. 1976. V.98. P.2672-2674.
76. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. 1. Evidence for its hemoprotein nature // J. Biol. Chem. 1964. V.239. P.2370-2378.
77. Leeman T., Bonnabry P., Dayer P. Selective inhibition of major drug metabolizing

- cytochrome P450 isozymes in human liver microsomes by carbon monoxide // Life Sci. 1994. V.54. P.951-956.
78. Canick J.A., Ryan K.J. Cytochrome P-450 and the aromatization of 16- α -hydroxytestosterone and androstenedione by human placental microsomes. // Mol. Cell. Endocrinol 1976. V.6. P.105-115.
 79. Gibbons G.F, Pullinger C.R., Mitropoulos K.A. Studies on the mechanism of lanosterol 14- α -demethylation: A requirement for two distinct types of mixed-function-oxidase systems // Biochem. J. 1979. V.183. P.309-315.
 80. Hansson R., Wikvall K. Hydroxylations in biosynthesis of bile acids: Cytochrome P-450 LM4 and 12 α -hydroxylation of 5 β cholestane-3 α ,7 α -diol // Eur J. Biochem. 1982. V.125. P.423-429.
 81. Meigs R.A., Ryan K.J. Enzymatic aromatization of steroids. I. Effects of oxygen and carbon monoxide on the intermediate steps of estrogen biosynthesis // J. Biol. Chem. 1971. V.246. P.83-87.
 82. Zachariah P.K., Juchau M.R. Interactions of steroids with human placental cytochrome P-450 in the presence of carbon monoxide // Life Sci. 1975. V.16. P.1689-1692.
 83. Tuckey R.C., Kamin H. Kinetics of O₂ and CO binding to adrenal cytochrome P-450_{sc}: Effect of cholesterol, intermediates, and phosphatidylcholine vesicles // J. Biol. Chem. 1983. V.258. P.4232-4237.
 84. Leeman T., Bonnabry P., Dayer P. Selective inhibition of major drug metabolizing cytochrome P450 isozymes in human liver microsomes by carbon monoxide // Life Sci. 1994. V.54. P.951-956.
 85. Cohen G.M., Mannering G.J. Involvement of a hydrophobic site in the inhibition of the microsomal para-hydroxylation of aniline by alcohols // Mol Pharmacol. 1972. V.8. P.383-397.
 86. Gerber M.C., Tejwani G.A., Gerber N., Bianchine J.R. Drug interactions with cimetidine: An update // Pharmacol. Ther. 1985. V.11. P.353-370.
 87. Testa B. Structural and electronic factors influencing the inhibition of aniline

- hydroxylation by alcohols and their binding to cytochrome P-450 // *Chem. Biol. Interact.* 1981. V.34. P.287-300.
88. Wattenberg L.W., Lam L.K.T., Fladmoe A.V.. Inhibition of chemical carcinogen-induced neoplasia by coumarins and alpha-angelicalactone // *Cancer Res.* 1979. V.39. P.1651-1654.
 89. Remmer H., Schenkman J., Estabrook R.W., Sasame H., Gillette J., Narasimhulu S. et al. Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome // *Mol. Pharmacol.* 1966. V.2. P.187-190.
 90. Jefcoate C.R., Gaylor X.L., Callabrese R.L. Ligand interactions with cytochrome P-450. 1. Binding of primary amines // *Biochemistry.* 1969. V.8. P.3455-3463.
 91. Schenkman J.B., Remmer H., Estabrook R.W. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome P-450 // *Mol. Pharmacol.* 1967. V.3. P.113-123.
 92. Dominguez O.V., Samuels L.T. Mechanism of inhibition of adrenal steroid 11-beta-hydroxylase by methopirapone (metopirone) // *Endocrinology.* 1963. V.73. P.304-309.
 93. Temple T.E., Liddle G.W. Inhibitors of adrenal steroid biosynthesis // *Ann. Rev. Pharmacol.* 1970. V.10. P.199-218.
 94. Rogerson T.D., Wilkinson C.F., Hetarski K. Steric factors in the inhibitory interaction of imidazoles with microsomal enzymes // *Biochem. Pharmacol.* 1977. V.26. P.1039-1042.
 95. Wilkinson C.R., Hetarski K., Cantwell G.R., DiCarlo F.J. Structure-activity relationships in the effects of 1-alkylimidazoles on microsomal oxidation in vitro and in vivo // *Biochem. Pharmacol.* 1974. V.23. P.2377-2386.
 96. Duquette P.H., Erickson R.R., Holtzman J.L. Role of substrate lipophilicity on the N-demethylation and type I binding of 3-O-alkylmorphine analogues // *J. Med. Chem.* 1983. V.26. P.1343-1348.
 97. Smith S.R., Kendall M.J. Ranitidine versus cimetidine. A comparison of their potential to cause clinically important drug interactions // *Clin. Pharmacokinet.*

1988. V.15. P.44-56.
98. Covey D.F. Aromatase inhibitors: Specific inhibitors of oestrogen biosynthesis. In Berg and Plempel (eds). Sterol Biosynthesis Inhibitors / Ellis Horwood Ltd. Cambridge. 1988. P.534-571.
 99. Henderson D., Habenicht U.-F., Nishino Y., Kerb U., El Etreby M.F. Aromatase inhibitors and benign prostatic hyperplasia // J. Steroid Biochem. 1986. V.25. P.867-876.
 100. Van Wauwe J.P., Janssen P.A.J. Is there a case for P-450 inhibitors in cancer treatment // J. Med Chem. 1989. V.32. P.2231-2239.
 101. Kellis J.T, Sheets J.J., Vickery L.E. Amino-steroids as inhibitors and probes of the active site of cytochrome P-450_{scc}. Effects on the enzyme from different sources // J. Steroid Biochem. 1984. V.20. P.671-676.
 102. Sheets J.J., Vickery L.E. Active sitedirected inhibitors of cytochrome P-450_{scc}: Structural and mechanistic implications of a side chain-substituted series of amino-steroids // J. Biol. Chem. 1983. V.258. P.11446-11452.
 103. Sheets J.J., Vickery L.E. Proximity of the substrate binding site and the heme-iron catalytic site in cytochrome P-450_{scc} // Proc. Natl. Acad Sci. USA. 1982. V.79. P.5773-5777.
 104. Nagahisa A., Foo T., Gut M., Orme-Johnson W.H. Competitive inhibition of cytochrome P-450_{scc} by (22R)- and (22S)-22-aminocholesterol: Side chain stereochemical requirements for C-22 amine coordination to the active-site heme // J. Biol. Chem. 1985. V.260. P.846-851.
 105. Vickery L.E., Singh J.. 22-Thio-23,24-bisnor-5-cholen-3 β -ol: An active site-directed inhibitor of cytochrome P450_{scc} // J. Steroid Biochem. 1988. V.29. P.539-543.
 106. Nagahisa A., Spencer R.W., Orme-Johnson W.H. Acetylenic mechanism-based inhibitors of cholesterol side chain cleavage by cytochrome P-450_{scc} // J. Biol. Chem. 1983. V.258. P.6721-6723.
 107. Olakanmi O., Seybert D.W. Modified acetylenic steroids as potent mechanism-

- based inhibitors of cytochrome P-450scc // *J. Steroid Biochem.* 1990. V.36. P.273-280.
108. Krueger R.J., Nagahisa A., Gut M., Wilson S.R., Orme-Johnson W.H. Effect of P-450scc inhibitors on corticosterone production by rat adrenal cells // *J. Biol. Chem.* 1985. V.260. P.852-859.
 109. Trahanovsky W.S., Himstedt A.L. Oxidation of organic compounds with cerium(IV). XX. Abnormally rapid rate of oxidative cleavage of (beta-trimethylsilylethyl)-phenylmethanol // *J. Am. Chem. Soc.* 1974. V.96. P.7974-7976.
 110. Nagahisa A., Orme-Johnson W.H., Wilson S.R.. Silicon mediated suicide inhibition: An efficient mechanism-based inhibitor of cytochrome P-450scc oxidation of cholesterol // *J. Am. Chem. Soc.* 1984. V.106. P.1166-1167.
 111. Miao E., Zuo C., Nagahisa A., Taylor B.J., Joardar S., Byon C. et al. Cytochrome P450scc mediated oxidation of (20S)-22-nor-22-thiacholesterol: Characterization of mechanismbased inhibition // *Biochemistry.* 1990. V.29. P.2199-2204.
 112. Brodie A.M., Dowsett H.M., Coombes R.C. Aromatase inhibitors as new endocrine therapy for breast cancer // *Cancer Treat. Res.* 1988. V.39. P.51-65.
 113. Brodie A.M.H., Banks P.K., Inkster S.E., Dowsett M., Coombes R.C. Aromatase inhibitors and hormone-dependent cancers // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1990. V.37. P.327-333.
 114. Johnston J.O. Aromatase inhibitors // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1998. V.33. P.375-405.
 115. Brodie A., Lu Q., Long B.. Aromatase and its inhibitors // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1999. V.69. P.205-210.
 116. Seralini G., Moslemi S.. Aromatase inhibitors: Past, present and future // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001. V.178. P.117-131.
 117. Recanatini M., Cavalli A., Valenti P. Nonsteroidal aromatase inhibitors: Recent advances // *Med Res. Rev.* 2002. V.22. P.282-304.
 118. Henderson D., Habenicht U.-F., Nishino Y., El Etreby M.E. Estrogens and benign

- prostatic hyperplasia: The basis for aromatase inhibitor therapy // *Steroids*. 1987. V.50. P.219-233.
119. Schweikert H.-U., Tunn U.W. Effects of the aromatase inhibitor testolactone on human benign prostatic hyperplasia // *Steroids*. 1987. V.50. P.191-199.
 120. Phillips G.B., CasteUi W.P., Abbott R.D., McNamara P.M. Association of hyperestrogenemia and coronary heart disease in men in the Framingham cohort // *Am. J. Med.* 1983. V.74. P.863-869.
 121. Santen R.J., Worgul T.J., Samojlik E., Interrante A., Boucher A.E., Lipton A. et al. A randomized trial comparing surgical adrenalectomy with aminoglutethimide plus hydrocortisone in women with advanced breast cancer // *Engl. J. Med.* 1981. V.305. P.545-551.
 122. Harris A.L., Powles T.J., Smith I.E., Coombes R.C., Ford H.T., Gazet J.C. et al. Aminoglutethimide for the treatment of advanced postmenopausal breast cancer // *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1983. V.19. P.11-17.
 123. Foster A.B., Jarman M., Leung C.S., Rowlands M.G., Taylor G.N., Plevy R.G. et al. Analogues of aminoglutethimide: Selective inhibition of aromatase // *J. Med. Chem.* 1985. V.28. P.200-204.
 124. Foster A.B., Jarman M., Leung C.S., Rowlands M.G., Taylor G.N.. Analogues of aminoglutethimide: Selective inhibition of cholesterol side-chain cleavage // *J. Med. Chem.* 1983. V.26. P.50-54.
 125. Demers L.M., Melby J.C., Wilson T. E., Lipton A., Harvey H.A., Santen R.J. The effects of CGS 16949A, an aromatase inhibitor on adrenal mineralocorticoidbiosynthesis. // *Clin. Endocrinol. Metab.* 1990. V.10. P.1162-1166.
 126. Lipton A., Harvey H.A., Demers L.M., Hanagan J.R., Mulagha M.T., Kochak G.M. et al. A phase I trial of CGS 16949A: A new aromatase inhibitor // *Cancer*. 1990. V.65. P.1279-1285.
 127. Bhatnagar A.S., Hausler A., Schieweck K., Browne L.J., Bowman R., Steele R.E. Novel aromatase inhibitors // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1990. V.37. P.363-

367.

128. Santen R.J., Demers L.M., Adlercreutz H., Harvey H., Santner S., Sanders S. et al. Inhibition of aromatase with CGS 16949 A in postmenopausal women // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1989. V.68. P.99-106.
129. Tominaga T., Adachi I., Sasaki Y., Tabei T., Ikeda T., Takatsuka Y. et al. Double-blind randomised trial comparing the non-steroidal aromatase inhibitors letrozole and fadrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer // Ann. Oncol. 2003. V.14. P.62-70.
130. Goss R.E., Smith R.E.. Letrozole for the management of breast cancer // Expert Rev. Anticancer Ther. 2002. V.2. P.249-260.
131. Wouters W., De Coster R., Tuman R.W., Bowden C.R., Bruynseels J., Vanderpas H. et al. Aromatase inhibition by R 76713: Experimental and clinical pharmacology // J. Steroid Biochem. 1989. V.34. P.427-430.
132. Wouters W., De Coster R., Van Dun J., Krekels M.D.W.G., Dillen A., Raeymaekers A. et al. Comparative effects of the aromatase inhibitor R76713 and of its enantiomers R83839 and R83842 on steroid biosynthesis in vitro and in vivo // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 1990. V.37. P.1049-1054.
133. Ahmed S., Adat S., Murrells A., Owen C.R., Amanuel Y. Design, synthesis, and evaluation of 4-(4')-aminobenzyl)-2-oxazolidinones as novel inhibitors of the cytochrome P-450 enzyme aromatase // Bioorg. Chem. 2002. V.30. P.315-331.
134. Buzdar A.U. Anastrozole (Arimidex) in clinical practice versus the old 'gold standard', tamoxifen // Expert. Rev. Anticancer Ther. 2002. V.2. P.623-629.
135. Wellington K., Faulds D.M. Anastrozole: In early breast cancer // Drugs. 2002. V.62. P.2483-2490.
136. Miller W.R., Stuart M., Sahmoud T., Dixon J.M. Anastrozole ('Arimidex') blocks oestrogen synthesis both peripherally and within the breast in postmenopausal women with large operable breast cancer // Br J. Cancer. 2002. V.87. P.950-955.
137. Wright J.N., Slatcher G., Akhtar M. Slow-binding' sixth-ligand inhibitors of cytochrome P-450 aromatase. Studies with 19-thiomethyl- and 19-azido-

- androstenedione // *Biochem. J.* 1991. V.273. P.533-539.
138. Delaisi C., Coucet B., Hartmann C., Trie B., Gourvest J.F., Lesuisse D. RU54115, a tight-binding aromatase inhibitor potentially useful for the treatment of breast cancer // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1992. V.41. P.113-111.
 139. Geelen J.A.A., Deckers G.H., Van Der Wardt J.T.H., Loozen H.J.J., Tax L.J.W., Kloosterboer H.J. Selection of 19-(ethyldithio)-androst-4-ene-3,17-dione (ORG 30958): A potent aromatase inhibitor in vivo // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1991. V.38(2). P.181-188.
 140. Lovett J.A., Darby M.V., Counsell R.E. Synthesis and evaluation of 19-aza- and 19-aminoandrostenedione analogues as potential aromatase inhibitors // *J. Med. Chem.* 1984. V.27. P.734-740.
 141. Bednarski P.J., Nelson S.D. Interactions of thiol-containing androgens with human placental aromatase // *J. Med. Chem.* 1989. V.32. P.203-213
 142. Metcalf B.W., Wright C.L., Burkhan J.P., Johnston J.O. Substrate-induced inactivation of aromatase by allenic and acetylenic steroids // *J. Am. Chem. Soc.* 1981. V.103. P.3221-3222.
 143. Covey D.G., Hood W.F., Parikh V.D. 10 β -Propynyl-substituted steroids: Mechanism-based enzyme-activated irreversible inhibitors of estrogen biosynthesis // *J. Biol. Chem.* 1981. V.256. P.1076-1079.
 144. Mann J., Pietrzak B. Preparation of aromatase inhibitors. Synthesis of 19,19-difluoro-4-hydroxyandrost-4-ene-3,7-dione and related compounds // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1987. P.7385-388.
 145. Furth P.S., Robinson C.H. Tritium release from [19-³H]19,19-difluoroandrost-4-ene-3,17-dione during inactivation of aromatase // *Biochemistry* 1989. V.28. P.1254-1259.
 146. Covey D.F., Hood W.F. Aromatase enzyme catalysis is involved in the potent inhibition of estrogen biosynthesis caused by 4-acetoxy- and 4-hydroxy-4-androstene-3,17-dione // *Mol. Pharmacol.* 1982. V.21. P.173-180.
 147. Brodie A.M.H., Banks P.K., Inkster S.E., Dowsett M., Coombes R.C. Aromatase

- inhibitors and hormone-dependent cancers // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1990. V.37. P.327-333.
148. Marsh D.A., Brodie E.J., Garrett W., Tsai-Morris C.-H., Brodie A.M. Aromatase inhibitors. Synthesis and biological activity of androstenedione derivatives // *J. Med. Chem.* 1985. V.28. P.788-795.
 149. Di Salle E., Briatico G., Giudici D., Ornati G., Zaccheo T. Aromatase inhibition and experimental antitumor activity of FCE 24304, MDL 18962 and SH 489 // *J. Steroid Biochem.* 1989. V.34. P.431-434.
 150. Numazawa M., Mutsumi A., Hoshi K., Tanaka Y. Androst-5-ene-7,17-dione: A novel class of suicide substrate of aromatase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. V.186. P.32-39.
 151. Covey D.E., Hood W.F. Enzyme-generated intermediates derived from 4-androstene-3,6,17-trione and 1,4,6-androstatriene-3,17-dione cause a time-dependent decrease in human placental aromatase activity // *Endocrinology.* 1981. V.108. P.1597-1599.
 152. Numazawa M., Midzuhashi K., Nagaoka M. Metabolic aspects of the 1^Δ-proton and the 19-methyl group of androst-4-ene-3,6,17-trione during aromatization by placental microsomes and inactivation of aromatase // *Biochem. Pharmacol.* 1994. V.47. P.717-726.
 153. Di Salle E., Giudici D., Briatico G., Ornati G. Novel irreversible aromatase inhibitors // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1990. V.595. P.357-367.
 154. Di Salle E., Ornati G., Giudici D., Lassus M., Evans T.R., Coombes R.C. Exemestane (FCE 24304), a new steroidal aromatase inhibitor // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1992. V.43. P.137-143.
 155. Marcotte P.A., Robinson C.H. Synthesis and evaluation of 10-beta-substituted 4-estrene-3,17-diones as inhibitors of human placental microsomal aromatase // *Steroids.* 1982. V.39. P.325-344.
 156. Johnston J.O. Studies with the steroidal aromatase inhibitor, 19-acetylenic androstenedione (MDL 18,962) // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1990. V.116. P.880.

157. Covey D.E., Hood W.E., Bensen D.D., Carrell H.L. Hydroperoxides as inactivators of aromatase: 10-Beta-hydroperoxy-4-estrene-3,17-dione, crystal structure and inactivation characteristics // *Biochemistry*. 1984. V.23. P.5398-5406.
158. Burkhardt J.P, Peet N.P., Wright C.L., Johnston J.O. Novel time-dependent inhibitors of human placental aromatase // *J. Med. Chem.* 1991. V.34. P.1748-1750.
159. Numazawa M., Yoshimura A., Tachibana M., Shelangouski M., Ishikawa M. Timedependent aromatase inactivation by 4 beta, 5 betaepoxides of the natural substrate androstenedione and its 19-oxygenated analogs // *Steroids*. 2002. V.67. P.185-193.
160. Vanden Bossche H., Willemsens G., Cools W., Marichal P., Lauwers W. Hypothesis on the molecular basis of the antifungal activity of N-substituted imidazoles and triazoles // *Biochem. Soc. Trans.* 1983. V.11,665-667.
161. Mercer E.I. Sterol biosynthesis inhibitors: Their current status and modes of action // *Lipids*. 1991. V.26. P.584-597.
162. Berg M., Plempel M. (eds.). *Sterol Biosynthesis Inhibitors* / Horwood. Ellis. 1988.
163. Nes W.R. Role of sterols in membranes // *Lipids*. 1974. V.9. P.596-612.
164. Yeagle P.L., Martin R.B., Lala A.K., Lin H.K., Block K. Differential effects of cholesterol and lanosterol on artificial membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977. V.74. P.4924-4926.
165. Freter C.E., Laderson R.C., Sibert D.E. Membrane phospholipid alterations in response to sterol depletion of LM cells // *J. Biol. Chem.* 1979. V.254. P.6909-6916.
166. Vanden Bossche H., Lauwers W., Willemsens G., Marichal P., Cornelissen E., Cools W. Molecular basis for the antimycotic and antibacterial activity of N-substituted imidazoles and triazoles: The inhibition of isoprenoid biosynthesis // *Pestic.Sci.* 1984. V.15. P.188-198.

167. Heeres J., De Brabander M., Vanden Bossche H. Ketoconazole: Chemistry and basis for selectivity. In P. Periti and G.G. Grossi (eds.). *Current Chemotherapy and Immunotherapy*, Vol. 2. American Society of Microbiology / Washington. DC. 1982.
168. Willemsens G., Cools W., Vanden Bossche H. Effects of miconazole and ketoconazole on sterol synthesis in a subcellular fraction of yeast and mammalian cells. In H. Van den Bossche (ed.). *The Host-Invader Interplay* / Elsevier. North Holland. Amsterdam. 1980.
169. Murray M., Ryan A.J., Little P.J. Inhibition of rat hepatic microsomal aminopyrine N-demethylase activity by benzimidazole derivatives: Quantitative structure-activity relationships // *J. Med Chem.* 1982. V.25. P.887-892.
170. Santen R.J., Vanden Bossche H., Symoens J., Brugmans J., DeCoster R. Site of action of low dose ketoconazole on androgen biosynthesis in men // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1983. V.57. P.732-736.
171. Gahder P., Mercer E.I., Baldwin B.C., Wiggins T.E. A comparison of the potency of some fungicides as inhibitors of sterol 14- demethylation // *Pest. Biochem. Physiol.* 1983. V.19. P.1-10.
172. Ito T., Aoyama Y., Ishida K., Kudoh M., Hori K., Tsuchiya S. et al. Selectivity of isoprenoidcontaining imidazole antifungal compounds for sterol 14-demethylase P450 (P450(14)DM) and 7-ethoxycoumarin O-deethylase P450 of rat liver microsomes // *Biochem. Pharmacol.* 1994. V.48. P.1577-1582.
173. Dolle R.E., Allaudeen H.S., Kruse L.I. Design and synthesis of 14a-methyl-15-aza-D-homosterols as novel antimycotics // *J. Med. Chem.* 1990. V.33. P.877-880.
174. Frye L.L., Cusack K.P., Leonard D.A., Anderson J.A. Oxolanosterol oximes: Dualaction inhibitors of cholesterol biosynthesis // *J. Lipid Res.* 1994. V.35. P.1333-1344.
175. Aoyama Y., Yoshida Y., Sonoda Y., Sato Y. 7-Oxo-24,25-dihydrolanosterol: A novel lanosterol 14a-demethylase {P-450 14DM) inhibitor which blocks electron transfer to the oxyferro intermediate // *Biochim. Biophys. Acta.* 1987. V.922.

P.270-277

176. Trzaskos J.M., Fischer R.T., Ko S.S., Magolda R.L., Stam S., Johnson P., Gaylor J.L. Substrate-based inhibitors of lanosterol 14 α -methyl demethylase: II. Time-dependent enzyme inactivation by selected oxylanosterol analogs // *Biochemistry*. 1995. V.30. P.9677–9681.
177. Trzaskos J.M., Magolda R.L., Favata M.F., Fischer R.T., Johnson R.R., Chen H.W. et al. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase by 15 α -fluorolanost-7-en-3 β -ol. A mechanism-based inhibitor of cholesterol biosynthesis // *J. Biol. Chem.* 1993. V.268. P.22591-22599.
178. Frye L.L., Cusack K.P., Leonard D.A. 32-Methyl-32-oxylanosterols: Dual-action inhibitors of cholesterol biosynthesis // *J. Med. Chem.* 1993. V.36. P.410-416.
179. Frye, L.L., C.H. Robinson. Novel inhibitors of lanosterol 14 α -methyl demethylase, a critical enzyme in cholesterol biosynthesis // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1988. P.129-131.
180. Mayer R.J., Adams J.L., Bossard M.J., Berkhout T.A. Effects of a novel lanosterol 14 α -demethylase inhibitor on the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in Hep G2 cells // *J. Biol. Chem.* 1991. V.266. P.20070-20078.
181. Frye L.L., Robinson C.H. Synthesis of potential mechanism-based inactivators of lanosterol 14 α -demethylase // *J Org. Chem.* 1990. V.55. P.1579-1584.
182. Tuck S.E., Robinson C.H., Silverton J.V. Assessment of the active-site requirements of lanosterol 14 α -demethylase: Evaluation of novel substrate analogues as competitive inhibitors // *J. Org. Chem.* 1991. V.56. P.1260-1266.
183. Bossard M.J., Tomaszek T.A., Gallagher T., Metcalf B.W., Adams J.L. Steroidal acetylenes: Mechanism-based inactivators of lanosterol 14 α -demethylase // *Bioorg. Chem.* 1991. V.19,418-432.
184. Swinney D.C., So O.Y., Watson D.M., Berry R.W., Webb A.S., Kertesz D.J. et al. Selective inhibition of mammalian lanosterol 14 α -demethylase by RS-21607 in vitro and in vivo // *Biochemistry*. 1994. V.33. P.4702-4713.

185. Редько Д.Д., Шляга И.Д., Шевченко Н.И. Системная антимикотическая терапия хронического грибкового риносинусита // Медицинская панорама. 2008. Т.9.
186. Apt W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease // Drug. Des. Devel. Ther. 2010. V.4. P.243–253.
187. Emad M., Hayati F., Fallahzadeh M.K., Namazi M.R. Superior efficacy of oral fluconazole 400 mg daily versus oral fluconazole 200 mg daily in the treatment of cutaneous leishmania major infection: a randomized clinical trial // J. Am. Acad. Dermatol. 2011. V.64(3). P.606-8.
188. Zhang W., Ramamoorthy Y., Kilicarslan T., Nolte H., Tyndale R.F., Sellers E.M. Inhibition of cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives // Drug Metab. Dispos 2002. V.30. P.314–318.
189. Hankins E.G., Gillespie J.R., Aikenhead K., Buckner F.S. Upregulation of sterol C14-demethylase expression in *Trypanosoma cruzi* treated with sterol biosynthesis inhibitors // Mol. Biochem. Parasitol. 2005. V.144. P.68–75.
190. Asai K., Tsuchimori N., Okonogi K., Perfect J.R., Gotoh O., Yoshida Y. Formation of azole-resistant *Candida albicans* by mutation of sterol 14-demethylase P450 // Antimicrob. Agents. Chemother. 1999. V.43. P.1163–1169.
191. Wyand R.A., Brown J.K. Sequence variation in the CYP51 gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides // Fungal. Genet. Biol. 2005. V.42. P.726–735.
192. Barrett M.P. Potential new drugs for human African trypanosomiasis: some progress at last // Curr. Opin. Infect. Dis. 2010 Dec. V.23(6). P.603-8.
193. Cooper A.B., Wright I.J., Ganguly A.K., Desai J., Loebenberg D., Parmegiani R., Feingold D.S., Sud I.J. Synthesis and antifungal properties of 14-aminomethyl-substituted lanosterol derivatives // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1989. V.12. P.898–900.
194. Еляков Г.Б., Стоник В.А. Стероиды морских организмов / Москва «Наука». 1988.

195. Мазейка А.Н., Попов А.М., Калинин В.И., Авилов С.А., Сильченко А.С., Костецкий Э.Я. Комплексообразование тритерпеновых гликозидов голотурий с холестерином как основа липид-сапониновых носителей субъединичных антигенов // Биофизика. 2008. Т.53(5), С.826-835.
196. Андрианова И.П., Рыженков В.Е., Лапук Я.И., Чистякова А.М., Кинтя П.К. Специфическое связывание холестерина энтеросорбентами // Вопросы медицинской химии. 1986. Т.32(2). С.80-82.
197. Kalinin V.I., Ivanchina N.V., Krasokhin V.B., Makarieva T.N., Stonik V.A. Glycosides from marine sponges (*Porifera*, *Demospongiae*): structures, taxonomical distribution, biological activities and biological roles // Mar Drugs. 2012. V.10(8). P.1671-710.
198. Димогло А.С., Чобан И.Н., Берсукер И.Б., Кинтя П.К., Балашова Н.Н. Структурные признаки антиоксидантной и фунгицидной активности стероидных гликозидов // Биоорг. Химия. 1985. Т.11(3). С.408-413.
199. Garoufi A., Vorre S., Soldatou A., Tsentidis C., Kossiva L., Drakatos A., Marmarinos A, Gourgiotis D. Plant sterols-enriched diet decreases small, dense LDL-cholesterol levels in children with hypercholesterolemia: a prospective study // Ital. J. Pediatr. 2014. V.3. P.40-42.
200. Hongu N., Kitts D.D., Zawistowski J., Dossett C.M., Kopec A., Pope B.T., Buchowski M.S. Pigmented rice bran and plant sterol combination reduces serum lipids in overweight and obese adults // J. Am. Coll. Nutr. 2014. V.33(3). P.231-8.
201. Borea P.A., Dalpiaz A., Varani K., Gilli P., Gilli G. Can thermodynamic measurements of receptor binding yield information on drug affinity and efficacy? // Biochemical Pharmacology. 2000. V.60. P.1549–1556.
202. Transition state thermodynamic analysis using Biacore T100, Application Note 80, Biacore systems / GE Healthcare Bio-Sciences AB. 2009.
203. Gilli P., Ferretti V., Gilli G., Borea P.A. Enthalpy-entropy compensation in drug-receptor binding // J. Phys. Chem. 1994. V.98. P.1515-1518.
204. Gilli P., Gilli G., Borea P.A., Varani K., Scatturin A., Dalpiaz A. Binding

- thermodynamics as a tool to investigate the mechanisms of drug-receptor interactions: thermodynamics of cytoplasmic steroid/nuclear receptors in comparison with membrane receptors // *J. Med. Chem.* 2005. V.48(6). P.2026-35.
205. Starikov E.B., Nordén B. Enthalpy-entropy compensation: a phantom or something useful? // *J. Phys. Chem. B.* 2007. V.111(51). P.14431-5.
 206. Cornish-Bowden A. Enthalpy-entropy compensation: a phantom phenomenon // *J. Biosci.* 2002. V.27(2). P.121-6.
 207. Иванов А.С. Исследование межмолекулярных взаимодействий с помощью оптических биосенсоров, работающих на эффекте поверхностного плазмонного резонанса // *Современные технологии в медицине.* 2012. Т.4. С.142-153.
 208. Lee J.W., Foote R.S. *Micro and Nano Technologies in Bioanalysis: Methods and Protocols* / Humana press. 2009.
 209. Homola J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors // *Anal Bioanal Chem.* 2003. V.377(3). P.528-39.
 210. Cooper M.A. Optical biosensors in drug discovery // *Nat Rev Drug Discov.* 2002. V.1(7). P.515-28.
 211. Trosken E.R., Straube E., Lutz W.K., Volkel W., Patten C. Quantitation of lanosterol and its major metabolite FF-MAS in an inhibition assay of CYP51 by azoles with atmospheric pressure photoionization based LC-MS/MS // *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2004. V.15. P.1216–1221.
 212. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Archakov A.I. Electrochemical reduction of cytochrome P450 as an approach to the construction of biosensors and bioreactors // *J. Inorg. Biochem.* 2005. V.99(5). P.1051-63.
 213. Шумянцева В.В., Булко Т.В., Мишарин А.Ю., Арчаков А.А. Поиск потенциальных ингибиторов цитохрома P450 17a1 (CYP17a1) электрохимическими методами // *Биомедицинская химия.* 2011. Т.57(4). С.402-409.
 214. Reipa V., Mayhew M.P., Holden M.J., Vilker V.L. Redox control of the P450cam

- catalytic cycle: effects of Y96F active site mutation and binding of a non-natural substrate // *Chem. Commun. (Camb)*. 2002. V.21(4). P.318-9.
215. Bistolas N., Christenson A., Ruzgas T., Jung C., Scheller F.W., Wollenberger U. Spectroelectrochemistry of cytochrome P450cam // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V.314(3). P.810-6.
 216. Bistolas N., Wollenberger U., Jung C., Scheller F.W. Cytochrome P450 biosensors – a review // *Biosens. Bioelectron.* 2005. V.20(12). P.2408-23.
 217. Шумянцева В.В., Махова А.А., Булко Т.В., Ших Е.В., Кукес В.Г., Усанов С.А., Арчаков А.И. Влияние антиоксидантов на электрокаталитическую активность цитохрома P450 3A4 // *Биомедицинская химия*. 2014. Т.60(2). С.224-234.
 218. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Rudakov Y.O., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Lisitsa A.V., Karuzina I.I., Archakov A.I. Electrochemical properties of cytochromes P450 using nanostructured electrodes: direct electron transfer and electro catalysis // *J. Inorg. Biochem.* 2007. V.101(5). P.859-65.
 219. Ghindilis A.L., Morzunova T.G., Barmin A.V., Kurochkin I.N. Potentiometric biosensors for cholinesterase inhibitor analysis based on mediatorless bioelectrocatalysis // *Biosens. Bioelectron.* 1996. V.11(9). P.873-80.
 220. Kicha A.A., Kalinovsky A.I., Levina E.V., Stonik V.A., Elyakov G.B. Asterosaponin P₁ from the starfish *Patiria pectinifera* // *Tetrahedron Lett.* 1983. V.24(36). P.3893-3896.
 221. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Gorshkova I.A., Ponomarenko L.P., Likhatskaya G.N., Stonik V.A. The distribution of free sterols, polyhydroxysteroids and steroid glycosides in various body components of the starfish *Patiria* (=Asterina) *pectinifera* // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2001. V.128(1). P.43-52.
 222. Kicha A.A., Kalinovskii A.I., Gorbach N.V., Stonik V.A. New polyhydroxysteroids from the far-eastern starfish *Henricia* sp. // *Chemistry of Natural Compounds*. March–April. 1993. V.29(2). P.206-210.

223. Kicha A.A., Kalinovskii A.I. Extraction of levisculoside-G from *Henricia derjugini* sea star and correction of echinasteroside-B1 and echinosteroside-B2 structure // *Khimiya prirodnih soedinenii*. 1993. V.4. P.619-620.
224. Кича А.А., Капустина И.И., Иванчина Н.В., Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Стоник В.А., Пальянова Н.В., Панкова Т.М., Старостина М.В. Полигидроксилированные стероидные соединения из дальневосточной морской звезды *Distolasterias nipon* // *Биорг. Химия*. 2008. Т.34(1). С.129-135.
225. Ivanchina N.V., Kicha A.A., Huong T.T.T., Kalinsky A.I., Dmitrenok P.S., Agafonova I.G., Long P.Q., Stonik V.A. Highly hydroxylated steroids of the starfish *Archaster typicus* from the Vietnamese waters // *Steroids*. 2010. V.75(12). P.897-904.
226. Pilipenko V.V., Sukhodub L.F., Aksyonov S.A., Kalinkevich A.N., Kintia P.K. 252Cf plasma desorption mass spectrometric study of interactions of steroid glycosides with amino acids // *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 2000. V.14(10). P.819-23.
227. Ershov P.V., Gnedenko O.V., Molnar A.A., Lisitsa A.V., Ivanov A.S., Archakov A.I., Biosensor analysis of the interaction of potential dimerization inhibitors with HIV-1 protease // *Biomedical Chemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2009. V.3. P.272-288.
228. Kitagawa I., Kobayashi M. Steroidal saponins from the starfish *Acanthaster planci* L. (Crown of thorns). (2). Structures of the major saponin thornasteroside A // *Chem. Pharm. Bull.* 1978. V.26(6). P.1864-1873.
229. Biacore T100 Getting Started / Biacore AB. 2005.
230. Majka J., Speck C. Analysis of protein-DNA interactions using surface plasmon resonance // *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007. V.104. P.13-36.
231. Lamb D.C., Kelly D.E., Waterman M.R., Stromstedt M., Rozman D., Kelly S.L. Characteristics of the heterologously expressed human lanosterol 14 α -demethylase (other names: P45014DM, CYP51, P45051) and inhibition of the

- purified human and *Candida albicans* CYP51 with azole antifungal agents // Yeast. 1999. V.15(9). P.755-63.
232. Trosken E.R., Adamska M., Arand M., Zarn J.A., Patten C., Volkel W., Lutz W.K. Comparison of lanosterol-14 alpha-demethylase (CYP51) of human and *Candida albicans* for inhibition by different antifungal azoles // Toxicology. 2006. V.228(1). P.24-32.