

Масамрех Рами Ахмад

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ
ПРЕПАРАТОВ СО СТЕРОИД-МЕТАБОЛИЗИРУЮЩИМИ ИЗОФЕРМЕНТАМИ
ЦИТОХРОМА P450

1.5.4. – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации совместно с Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Шумянцева Виктория Васильевна

Официальные оппоненты: **Штиль Александр Альбертович,**
д.м.н., заведующий лабораторией механизмов гибели
опухолевых клеток НИИ канцерогенеза ФГБУ "НМИЦ
онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России

Федотова Юлия Олеговна,
д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории
нейроэндокринологии Института физиологии имени И.
П. Павлова РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова»

Защита состоится «25» ноября 2021 года в 11 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.172.01 (Д 001.010.01) при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) по адресу: 119121, гор. Москва, Погодинская ул., д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» и на сайте www.ibmc.msk.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень её разработанности

Рак предстательной железы является одним из наиболее распространённых заболеваний среди мужчин старше 40 лет, проживающих в развитых странах. Современной стратегией фармакотерапии кастрационно-резистивного рака предстательной железы является, с одной стороны, снижение уровня андрогенов за счёт использования ингибиторов 17 α -гидроксилазы, 17,20-лиазы (цитохрома P450 17A1, CYP17A1) – ключевого фермента биосинтеза андрогенов, а с другой – блокирование взаимодействия андрогенов с рецепторами андрогенов опухолевых клеток за счёт применения антагонистов рецептора (Alex A.B. et al., 2016; Li Z. et al., 2015). CYP17A1 катализирует реакцию 17 α -гидроксилирования прегненолона и прогестерона с образованием соответствующих производных (являющихся предшественниками как половых, так и кортикостероидных гормонов) и последующую 17,20-лиазную реакцию, приводящую к образованию андрогенов – дегидроэпиандростерона и андростендиона, соответственно (Yoshimoto F.K. and Auchus R.J., 2015).

Препарат абиратерон (17-(3-пиридил)андроста-5,16-диен-3 β -ол), являющийся эффективным ингибитором CYP17A1 был введён в клиническую практику и на сегодняшний день является «золотым стандартом» в лечении рака предстательной железы. Следует отметить, что одним из основных побочных эффектов абиратерона является неселективность в отношении 17,20-лиазной реакции, приводящей к образованию андрогенов, и подавление 17 α -гидроксилазной активности CYP17A1, что приводит к снижению биосинтеза глюкокортикоидов и возрастанию уровня минералокортикоидов (Attard G. et al., 2012). В связи с этим продолжается поиск более эффективных и селективных ингибиторов CYP17A1, перспективных в качестве лекарственных соединений для лечения рака предстательной железы. Кроме того, активно изучаются метаболизм противоопухолевых препаратов для лечения рака предстательной железы и фармакологические свойства образующихся метаболитов. Было установлено, что в организме под действием 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы (3 β -HSD) абиратерон подвергается окислению по гидроксильной группе в третьем положении стероидного фрагмента с образованием более активного 3-кето- Δ 4-производного абиратерона (D4A) (Li Z. et al., 2015; Li Z. et al., 2016). Как было показано, данный метаболит ингибирует не только CYP17A1, но и 3 β -HSD, а также стероид-5 α -редуктазу (SRD5A) – ключевые ферменты биосинтеза андрогенов (Li Z. et al., 2015). Кроме того, метаболит D4A проявил более высокую, чем абиратерон, антагонистическую активность по отношению к рецептору андрогенов, сравнимую по эффективности с известным антагонистом рецептора андрогенов энзалутамидом (4-(3-(4-циано-3-(трифлуорометил)фенил)-5,5-диметил-4-оксо-2-тиоксоимидазолидин-1-ил)-2-флуоро-N-метилбензамид) (Li Z. et al., 2015). Также D4A продемонстрировал большую, по сравнению с абиратероном, противоопухолевую активность на ксенографтах у мышей (Li Z. et al., 2015). На основании проведённого комплексного исследования авторы заключили, что D4A более фармакологически активен, по сравнению с абиратероном, оказывая влияние на несколько молекулярных мишеней противоопухолевой терапии, что представляет интерес для дальнейших исследований метаболита абиратерона D4A в качестве потенциального препарата для лечения рака предстательной железы. В более ранней работе группой профессора Ахуса (Auchus) химическим синтезом были получены и охарактеризованы производные абиратерона, отличающиеся структурой кольца А стероидного фрагмента, в том числе и D4A (Garrido M. et al., 2014). Методом дифференциальной абсорбционной спектроскопии авторы показали, что D4A более эффективно связывается с CYP17A1, по сравнению с абиратероном (значения констант диссоциации комплексов были определены как 0,1 нМ и 2,6 нМ, соответственно). Однако эффективность ингибирования CYP17A1 метаболитом абиратерона D4A и абиратероном практически не отличалась (значения констант

ингибирования по отношению к 17α -гидроксилазной активности CYP17A1 были определены как 22 нМ и 27 нМ, соответственно). Кроме того, оба ингибитора демонстрировали смешанный тип ингибирования CYP17A1. Последующие исследования показали, что D4A подвергается дальнейшему метаболизму у пациентов с кастрационно-резистивным раком простаты под действием SRD5A и стероид- 5β -редуктазы (SRD5B) с образованием соответствующих восстановленных производных абиратерона (5α -абиратерон и 5β -абиратерон), которые в дальнейшем могут подвергаться восстановлению под действием 3α -гидроксистероид дегидрогеназы (3α -HSD) и 3β -HSD (Li Z. et al., 2016). Авторы также показали, что 5α -восстановленные производные абиратерона проявляют свойства агониста рецептора андрогенов, в отличие от практически неактивных 5β -восстановленных производных абиратерона. Использование ингибиторов SRD5A (финастерид, дутастерид) совместно с абиратероном в комплексной терапии способно аккумулировать в организме D4A, потенцируя тем самым фармакологический эффект абиратерона (Li Z. et al., 2015; Salvador J.A. et al., 2013). Кроме того, было высказано предположение, что дальнейшая разработка ингибиторов фермента SRD5B, вызывающего инактивацию D4A, позволит в большей степени увеличить фармакологический потенциал 3-кето- $\Delta 4$ -метаболита абиратерона. Таким образом, дальнейшая перспектива использования D4A в качестве лекарственного препарата и фармакологическая регуляция его метаболизма в организме с целью его аккумуляции требует всестороннего исследования его взаимодействия с другими потенциальными мишенями, в том числе и ключевыми ферментами метаболизма стероидов. Несмотря на высокий фармакологический потенциал D4A, его вероятное взаимодействие с изоферментами цитохрома P450, в том числе участвующими в метаболизме кетостероидов, на сегодняшний день остаётся неизученным. Такого рода взаимодействия могут усугублять побочные эффекты, характерные для абиратерона – значительнее нарушать метаболизм кортикостероидов.

Препарат галетерон (17-(1*H*-бензимидазол-1-ил)андроста-5,16-диен- 3β -ол, ТОК-001, VN/124) рассматривается в качестве противоопухолевого препарата для лечения рака предстательной железы (Alyamani M. et al., 2017). Галетерон более эффективно и селективно ингибирует 17,20-лиазную активность CYP17A1, чем абиратерон (IC_{50} 300 нМ и 800 нМ для галетерона и абиратерона, соответственно) (Handratta V.D. et al., 2005; Montgomery B. et al., 2016). Галетерон обладает большим сродством к рецептору андрогенов в клетках линии рака предстательной железы LNCaP, по сравнению с абиратероном (Handratta V.D. et al., 2005). Действие галетерона в большей степени связано с антагонизмом рецептора андрогенов. Также, как и для абиратерона, было установлено, что галетерон подвергается окислению под действием 3β -HSD с образованием соответствующего фармакологически активного 3-кето- $\Delta 4$ -производного галетерона (D4G), который в дальнейшем подвергается действию SRD5A, SRD5B, 3β -HSD и 3α -HSD (Alyamani M. et al., 2017). Взаимодействие галетерона и его метаболитов, как и взаимодействие D4A со стероид-метаболизирующими изоформами цитохрома P450 практически не изучено.

Поскольку ингибиторы CYP17A1 и их метаболиты, являющиеся перспективными противоопухолевыми агентами для лечения рака предстательной железы, имеют стероидную структуру, велика вероятность их взаимодействия с цитохромами P450, катализирующими отдельные стадии стероидогенеза, что может обуславливать их побочные эффекты, в том числе один из основных – нарушение метаболизма кортикостероидов, приводящее к относительному увеличению уровня минералокортикоидов и относительному снижению уровня глюкокортикоидов. Так, было показано, что абиратерон напрямую взаимодействует со стероид 21-гидроксилазой (CYP21A2), катализирующей 21-гидроксилазную реакцию по отношению к прогестерону и его 17α -гидроксилированному производному с образованием кортикостероидов – дезоксикортикостерона и 11-дезоксикортизола, соответственно (Malikova J. et al., 2017). Было сделано заключение, что абиратерон вызывает комплексные изменения в метаболизме стероидов вследствие ингибирования как 17α -гидроксилазной активности

CYP17A1, так и CYP21A2, приводящие к значительному снижению биосинтеза глюкокортикоидов. Абиратерон также ингибирует стероид 11 β -гидроксилазу (CYP11B1) и альдостеронсинтазу (CYP11B2), что приводит к изменению продукции кортикостероидных гормонов (Hu Q. et al., 2010; Yin L. and Hu Q., 2014).

В качестве потенциальной фармакологической мишени для лечения гормон-зависимых опухолей рассматривается цитохром P450 51A1 (CYP51A1), катализирующий реакцию 14 α -деметилования ланостерина с образованием 14-десметилланостерина (4,4-диметилхолеста-8(9),14,24-триен-3 β -ола), являющегося предшественником биосинтеза холестерина и, следовательно, стероидных гормонов (Lepesheva G.I. and Waterman M.R., 2007). Ингибирование синтеза холестерина может приводить не только к снижению продукции стероидных гормонов, активирующих пролиферацию клеток опухолей, но и к нарушению формирования клеточных мембран (Hargrove T.Y. et al., 2016).

Известно, что существенную роль в развитии рака предстательной железы играют эстрогены (Bosland M.C. and Mahmoud A.M., 2011; Dobbs R.W. et al., 2019). Ключевым ферментом биосинтеза эстрогенов, катализирующим реакцию ароматизации кольца А андростендиона и тестостерона, приводящую к образованию эстрадиола и эстрона, соответственно, является цитохром P450 19A1 (ароматаза, CYP19A1). В норме клетки предстательной железы экспрессируют ядерные рецепторы эстрогенов ЭР- α и ЭР- β , а также сопряжённый с G-белком рецептор 30 (GPR30) (Dobbs R.W. et al., 2019). Кроме того, клетки предстательной железы человека экспрессируют ароматазу (Ellem S.J. and Risbridger G.P., 2009), обеспечивающую собственный биосинтез эстрогенов. Принято считать, что активация ЭР- β связана с антипролиферативным эффектом по отношению к клеткам рака предстательной железы, в то время как активация ЭР- α обеспечивает эпителиально-мезенхимальный переход, способствуя опухолевой прогрессии (Dobbs R.W. et al., 2019). Таким образом, изменение уровня биосинтеза эстрогенов может существенно влиять на развитие рака предстательной железы и модулировать фармакологическую активность противоопухолевых препаратов. В литературе имеются данные об отсутствии ингибирующего действия абиратерона и галетерона на CYP19A1 (Hu Q. and Hartmann R.W., 2014; Udhane S.S. et al., 2016), при этом влияние их 3-кето- Δ 4-метаболитов на этот фермент не изучено.

Кроме перечисленных выше метаболических превращений, абиратерон подвергается метаболизму при участии цитохрома P450 3A4 (CYP3A4) и гидроксистероидсульфотрансферазы (SULT2A1) с образованием фармакологически неактивной формы абиратерона – N-оксид сульфата абиратерона (Alex A.B. et al., 2016). По сравнению с абиратероном, взаимодействие его фармакологически активного метаболита D4A, а также галетерона и D4G с ферментами метаболизма ксенобиотиков, такими как CYP3A4, остаётся практически не изученным. CYP3A4-зависимый метаболизм противоопухолевых стероидных препаратов может приводить к образованию продуктов с изменённой биологической активностью, в том числе токсичных соединений, и обуславливать межлекарственные взаимодействия на уровне этого фермента. CYP3A4, обладая низкой субстратной специфичностью и большим активным центром, участвует в биотрансформации широкого спектра ксенобиотиков (в том числе более 50% всех лекарственных препаратов) и эндогенных соединений, среди которых эндогенные стероидные гормоны и лекарственные препараты стероидной структуры (тестостерон, кортизол) (Ortiz de Montellano P.R., 2015), следовательно, разрабатываемые противоопухолевые препараты могут являться как субстратами, так и ингибиторами этого изофермента.

Таким образом, исследование взаимодействия стероидных ингибиторов CYP17A1, разрабатываемых или применяемых в клинической практике для лечения рака предстательной железы, со стероид-метаболизирующими ферментами суперсемейства цитохрома P450 является актуальной задачей с позиций рационализации применения этой группы лекарственных препаратов.

Цель и задачи работы

Целью настоящей работы являлся поиск молекулярных мишеней потенциальных противоопухолевых препаратов для лечения рака предстательной железы среди стероид-метаболизирующих цитохромов P450 и установление механизмов их взаимодействия с целью прогноза возможных побочных эффектов фармакотерапии.

Для достижения цели диссертационной работы были поставлены следующие **задачи**:

1) установить молекулярные механизмы взаимодействия ингибиторов цитохрома P450 17A1 (абиратерона, галетерона и соответствующих 3-кето- Δ 4-метаболитов (D4A и D4G)) с активными центрами стероид-метаболизирующих ферментов суперсемейства цитохрома P450 (CYP21A2, CYP51A1, CYP11A1, CYP19A1, CYP3A4) с помощью абсорбционной спектроскопии;

2) определить равновесные параметры взаимодействия лигандов с активными центрами стероид-метаболизирующих ферментов суперсемейства цитохрома P450;

3) провести анализ субстрат-ингибиторных свойств исследуемых соединений по отношению к стероид-метаболизирующим ферментам суперсемейства цитохрома P450 на основании установленных с помощью абсорбционной спектроскопии механизмов взаимодействий, используя реконструированные и электрохимические ферментативные системы.

Личный вклад автора

Соискателем проработана отечественная и зарубежная литература по теме диссертации. Автор диссертационной работы непосредственно принимал участие в планировании и постановке экспериментов, самостоятельно проводил необходимые расчёты и статистическую обработку полученных экспериментальных данных. Молекулярный докинг проводился при непосредственном участии сотрудников лаборатории структурной биоинформатики ИБМХ (заведующий лабораторией д.б.н. Веселовский Александр Владимирович и м.н.с. Щербаков Кирилл Андреевич), масс-спектрометрический анализ проводился при непосредственном участии м.н.с. лаборатории системной биологии ИБМХ к.б.н. Завьяловой Марии Геннадиевны и с.н.с. группы масс-спектрометрии ЦКП «Протеом человека» к.б.н. Торопыгина Ильи Юрьевича, синтез метаболита галетерона D4G проводился при непосредственном участии начальника лаборатории феромонов АО «Щёлково Агрохим» к.х.н. Стулова Сергея Владимировича.

Научная новизна работы

Впервые методами абсорбционной спектроскопии исследовано взаимодействие противоопухолевых соединений (абиратерона, галетерона и их 3-кето- Δ 4-метаболитов), являющихся фармакологическими агентами для лечения рака предстательной железы, с активными центрами стероид-метаболизирующих изоферментов цитохрома P450 (CYP21A2, CYP51A1, CYP11A1, CYP19A1, CYP3A4). На основании проведённого анализа выявлены молекулярные мишени новых противоопухолевых соединений и получены равновесные значения спектральных констант диссоциации соответствующих комплексов. Методами молекулярного докинга охарактеризованы комплексы исследуемых противоопухолевых соединений с активными центрами CYP21A2, CYP51A1, CYP11A1, CYP19A1, CYP3A4. Впервые была исследована ингибиторная активность D4A, галетерона и D4G по отношению к одному из ключевых ферментов биосинтеза кортикостероидных гормонов – CYP21A2. Впервые выявлены субстратные свойства абиратерона и галетерона по отношению к CYP51A1 с помощью электрохимической системы. На основании полученных результатов предсказаны возможные побочные эффекты исследованных соединений, что позволит рационализировать их применение в клинической практике.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретической значимостью работы является выявление среди стероид-метаболизирующих цитохромов P450 молекулярных мишеней абиратерона, D4A, галетерона, D4G и установление механизмов взаимодействия для выявленных пар.

Практической значимостью работы является возможность спрогнозировать побочные эффекты вследствие взаимодействий новых противоопухолевых соединений для лечения рака предстательной железы со стероид-метаболизирующими цитохромами P450. Выявленные взаимодействия позволяют спрогнозировать изменения метаболизма стероидных гормонов: изменение активности CYP21A2 может усилить основной побочный эффект ингибиторов CYP17A1; CYP51A1 – приводить как к снижению биосинтеза стероидов, так и к нарушению образования мембран опухолевых клеток; CYP19A1 – приводить к нарушению биосинтеза эстрогенов, что может неоднозначно влиять на прогрессию рака предстательной железы; CYP3A4 – вызывать межлекарственные взаимодействия, что стоит учитывать при совместном приёме препаратов, метаболизируемых этим ферментом.

Положения, выносимые на защиту

1. Абиратерон, галетерон и соответствующие 3-кето- Δ 4-метаболиты (D4A и D4G)) взаимодействуют с активным центром CYP21A2, при этом абиратерон и D4A индуцируют спектральные изменения II типа, а галетерон и D4G – I типа;
2. D4A и галетерон ингибируют CYP21A2;
3. Абиратерон, D4A, галетерон и D4G взаимодействуют с активным центром CYP51A1, вызывая спектральные изменения I типа;
4. Абиратерон взаимодействует с активным центром CYP11A1, вызывая спектральные изменения II типа;
5. D4A взаимодействует с активным центром CYP19A1, вызывая спектральные изменения II типа и ингибируя фермент.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные выводы работы и положения, выносимые на защиту, являются обоснованными и полностью соответствуют полученным результатам. Достоверность выводов подтверждается адекватной статистической обработкой данных.

Материалы работы были представлены на следующих международных и всероссийских научных конференциях: Третий съезд аналитиков России (8-13 октября 2017, Москва, Россия); V Юбилейная конференция МОБИ-ХимФарма2019 «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (15-18 сентября 2019, Судак, Крым, Россия); II Объединенный научный форум: VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (1-6 октября 2019, Сочи, Россия); 24-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века» (5-7 октября 2020, Пущино, Россия).

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 8 статей в рекомендованных ВАК РФ изданиях и 4 работы в сборниках трудов конференций.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста, включает 61 рисунок и 1 таблицу. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), материалов и методов (Глава 2), результатов и их обсуждения (Глава 3), заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 129 источников.

Диссертационная работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 17-75-20250) и Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 18-315-00043 и № 19-315-70003).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. Абиратерон (чистота $\geq 99\%$) получен от ChemLeader, Ltd., Китай; галетерон (чистота $\geq 98\%$), глицерин (чистота $\geq 99,5\%$), глюкозо-6-фосфат (чистота $\geq 98\%$), глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа из пекарских дрожжей (*S. cerevisiae*) (тип VII, суспензия с сульфатом аммония, ≥ 200 ед/мг белка, 2295 МЕ/мл), дидодецилдиметиламмония бромид (ДДАБ) (чистота 98%), диметилсульфоксид (ДМСО) (чистота $\geq 99,7\%$), изопропоксид алюминия (чистота $\geq 98\%$), кетоконазол (чистота $\geq 99\%$), кортизол (чистота $\geq 98\%$), метаболит абиратерона D4A (чистота $\geq 98\%$), метанол (чистота $\geq 99,9\%$), муравьиная кислота (чистота $\geq 99\%$), прогестерон (чистота $\geq 99\%$), серная кислота (чистота $\geq 95\%$), толуол (безводный, чистота 99,8%), трифторуксусная кислота (чистота $\geq 99\%$), хлороформ (чистота $\geq 99,5\%$), циклогексанон (чистота 99,8%), этанол (чистота $\geq 96\%$), этилацетат (чистота $\geq 99,8\%$), KH_2PO_4 (чистота $\geq 99\%$), K_2HPO_4 (чистота $\geq 98\%$), NaCl (чистота $\geq 99,5\%$), 1,2-дидодеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (чистота $\geq 99\%$, синтетический), 21-гидроксипрогестерон (чистота $\geq 97\%$), 2,5-дигидробензойная кислота (чистота $\geq 99\%$), 6 β -гидроксикортизол (чистота $\geq 98\%$) получены от Sigma-Aldrich, США; хлорид метилена (чистота $\geq 99\%$, стабилизированный 0,08% этанолом) получен от ECOS-1, Россия; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (чистота 99%) получен от Acros organics, США; NADPH (чистота $\geq 97\%$) получен от Sorachim, Швейцария; ацетонитрил (чистота $\geq 99,8\%$) получен от Fisher Scientific, Англия. Препараты ферментов (CYP21A2, CYP51A1, CYP11A1, CYP19A1, CYP3A4 человека, а также NADPH-зависимая цитохром P450 редуктаза крысы) получены в Институте биоорганической химии НАН Беларуси, как описано ранее (Kaluzhskiy L.A. et al., 2014; Davydov R. et al., 2015; Yablokov E.O. et al., 2019; Gilep A.A. et al., 2001).

Оборудование. Спектрофотометрические измерения проводились с помощью спектрофотометра CARY 100 Scan UV-Vis (Agilent Technologies, Inc., США) с программным обеспечением Cary WinUV или с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1900 (Shimadzu Corporation, Япония) с программным обеспечением UV Probe 2.70. Масс-спектрометрические измерения проводились с помощью масс-спектрометра FTICR MS ApexUltra (Bruker, Германия) или масс-спектрометра Bruker Daltonics Ultraflex TOF/TOF, снабжённого LIFT-MS/MS, полученные данные анализировались с помощью программы DataAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics, Германия). Электрохимические измерения проводились с использованием потенциостата/гальваностата PGSTAT 12 Autolab или μ Autolab Type III (Metrohm Autolab BV, Нидерланды) с программным обеспечением GPES (версия 4.9.7) при комнатной температуре ($22 \pm 3^\circ\text{C}$). В работе использовались трёхконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО «КолорЭлектроникс», Россия); с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения (ПГЭ). Диаметр рабочего электрода 0,2 см (площадь 0,0314 см²). Электрохимические измерения в анаэробных условиях проводились в пластиковой проточной ячейке (PalmSens BV, Нидерланды), в аэробных условиях – в пластиковых ячейках объёмом 300 мкл или 1 мл. Все электрохимические потенциалы в диссертационной работе приводятся относительно хлоридсеребряного (Ag/AgCl) электрода сравнения. Навески взвешивались на электронных аналитических весах VIBRA (HT) (SHINKO DENSHI Co., Ltd., Япония) или OHAUS Pioneer PA214C (Ohaus Corporation, США) с точностью до 0,1 мг. Измерение величины pH растворов проводилось с помощью pH-метра inoLab Multi 740 Multimeter с комбинированным pH электродом SenTix 81 (WTW, Германия).

Химический синтез метаболита галетерона D4G. Химический синтез метаболита галетерона D4G был выполнен путём окисления гидроксильной группы в третьем положении по методу Оппенауэра. Галетерон (25 мг, 0,064 ммоль) был добавлен в раствор изопропоксида алюминия (20 мг, 0,1 ммоль) в 0,5 мл абсолютного толуола и 0,5 мл циклогексанона. Смесь кипятилась при постоянном перемешивании в течение 4 часов. Затем избыток циклогексанона и толуола был удалён под вакуумом, а остаток

ресуспендировался в 2 мл этилацетата с последующей фильтрацией. Фильтрат упаривался с последующей экстракцией целевого продукта препаративной тонкослойной хроматографией (с помощью стеклянных пластин для тонкослойной хроматографии с нанесённым на поверхность силикагелем с флуоресцентным агентом (PLC Silica gel 60 F₂₅₄ с толщиной слоя 2 мм, Merck, Германия)), в качестве подвижной фазы использовалась смесь хлорид метилена:метанол (10:0,25). Выход конечного продукта составил 40%. Образование продукта детектировалось с помощью масс-спектрометрии в положительном режиме с помощью FTICR MS ApexUltra (Bruker, Германия). Образцы вводились в источник электроспрейной ионизации со скоростью 1,5 мкл/мин с потоком распыляющего газа 2 л/мин. Температура входного капилляра 200°C, поток сухого газа – 3 л/мин, ионизирующий потенциал 3,6 кВ. После каждого измерения капилляр промывался смесью ацетонитрил:вода (4:1) в течение 30 минут. Масс-спектры визуализировались с помощью DataAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics, Германия). Значение m/z для D4G ($[C_{26}H_{30}N_2O + H]^+$) было рассчитано как 387,2431 и найдено – 387,2435.

Абсорбционная спектроскопия. Исследования по взаимодействию абиратерона, D4A, галетерона и D4G с изоферментами цитохрома P450 (CYP21A2, CYP51A1, CYP11A1, CYP19A1, CYP3A4) проводились методом абсорбционной спектроскопии. 150 мкМ CYP21A2 (в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,2% CHAPS, 0,3 М NaCl, 3 мМ β-меркаптоэтанол и 20% глицерина по объёму), 121 мкМ CYP51A1 (в 300 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,2% CHAPS, 1 мМ дитиотреитол и 20% глицерина по объёму), 45 мкМ CYP19A1 (в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,3 М NaCl, 0,2% CHAPS и 20% глицерина по объёму), 118 мкМ CYP11A1 (в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,3 М NaCl, 0,2% CHAPS и 20% глицерина по объёму) и 131 мкМ CYP3A4 (в 550 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,2% CHAPS, 1 мМ дитиотреитол и 20% глицерина по объёму) были разведены до концентраций 5 мкМ, 5 мкМ, 4,5 мкМ, 5 мкМ и 5 мкМ, соответственно, 50 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 20% глицерина по объёму. Полученный раствор соответствующего фермента вносился в кварцевые кюветы (опытная и контрольная кюветы) объёмом 50 мкл с последующим прописыванием базовой линии в диапазоне длин волн 350–500 нм. Затем в опытную кювету вносили аликвоты абиратерона в этаноле, D4A, галетерона или D4G в метаноле, при этом в контрольную кювету вносили соответствующие объёмы органического растворителя (этанола или метанола). Конечная концентрация органического растворителя в системе не превышала 3% по объёму. Параметры связывания исследуемых соединений с изоферментами цитохрома P450 были рассчитаны, используя программное обеспечение OriginPro 7.5 или 8.1, путём нелинейной регрессии зависимости разности поглощения цитохромов P450, полученных с помощью дифференциальной абсорбционной спектроскопии, в максимуме и минимуме от концентрации соответствующего лиганда в инкубационной смеси.

Исследование ингибиторной активности D4A, галетерона и D4G по отношению к CYP21A2. Ингибиторная активность D4A по отношению к CYP21A2 исследовалась с помощью реконструированной ферментативной системы: 115 мкл 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 20% глицерина по объёму и 13 мМ 1,2-дидодеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, подвергали ультразвуковой дезинтеграции в ультразвуковой бане Elmasonic S10H (Elma, Германия) в течение 5 минут при температуре 35°C, затем добавляли 10 мкл 15 мМ MgCl₂, 1 мкл 150 мкМ рекомбинатного цитохрома CYP21A2 человека, 1 мкл 165,9 мкМ рекомбинантной NADPH-зависимой цитохром P450 редуктазы крысы, 10 мкл 75 мМ глюкозо-6-фосфата, 1 мкл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 1 мкл прогестерона в ДМСО или в метаноле (диапазон концентраций от 1 до 100 мкМ в системе) и 1 мкл D4A, галетерона или D4G в метаноле (диапазон концентраций от 1 до 25 мкМ в системе) или 1 мкл метанола в качестве контроля. Реакция инициировалась добавлением 10 мкл 75 мМ NADPH. Инкубация проводилась от 1 до 15 минут при 37°C и постоянном перемешивании (700 rpm) с использованием

термошейкера TS-100C (Biosan, Латвия). Остановка реакции и экстракция стероидов проводились добавлением двойного объёма (300 мкл) хлороформа. Полученный раствор центрифугировали 5 минут при 13400 rpm ($12100 \times g$) с помощью микроцентрифуги Minispin (Eppendorf, Германия). Экстракция стероидов проводилась дважды для каждого из образцов. После экстракции нижняя фаза отбиралась, переносилась в чистую пробирку или виалу и упаривалась при 58°C под потоком аргона. Упаренные образцы растворяли в 20 мкл этанола и наносили на алюминиевые пластины для тонкослойной хроматографии с силикагелем с флуоресцентным агентом (TLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Германия). Также в качестве контроля на пластину наносили 1 мкл прогестерона (10 мМ), 21-гидроксипрогестерона (10 мМ) и D4A (10 мМ) в этаноле. Хроматографическое разделение проводилось в стеклянной хроматографической ячейке с помощью подвижной фазы, состоящей из хлороформа и этилацетата (3:1). После хроматографии стероиды визуализировали с помощью лампы с длиной волны 254 нм (Vilber Lourmat, Франция). Пятна, соответствующие 21-гидроксипрогестерону, изолировали и элюировали с помощью 600 мкл этанола. Частицы силикагеля осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 13400 rpm ($12100 \times g$). Концентрацию 21-гидроксипрогестерона в супернатанте определяли спектрофотометрически в кварцевых кюветах на 500 мкл при длине волны примерно 240 нм по калибровочной зависимости, построенной с использованием стандартных растворов аналита. Активность CYP21A2 выражалась в количестве 21-гидроксипрогестерона в нмоль, образующегося в реконструированной системе за 1 минуту 1 нмоль фермента. Данные анализировали с помощью программного обеспечения OriginPro 8.1.

Исследование электрокаталитической активности CYP51A1 по отношению к абиратерону и галетерону. Активность CYP51A1 по отношению к абиратерону и галетерону исследовалась с помощью электрохимической системы на основе рекомбинантного фермента, иммобилизованного на модифицированном дидодецилдиметиламмония бромидом (ДДАБ) электроде. Для конструирования электрохимической ферментной системы в работе использовали электроды с графитовыми рабочим (диаметр 2 мм) и вспомогательными электродами и хлоридсеребряным электродом сравнения (Ag/AgCl), полученные методом трафаретной печати (ООО «КолорЭлектроникс»). На поверхность рабочего графитового электрода наносили 1 мкл 100 мМ ДДАБ в хлороформе. После испарения хлороформа (10 минут) наносили 1 мкл CYP51A1, разведённого до 20,2 мкМ 100 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 50 мМ NaCl. Электроды оставляли на 12 часов во влажной камере при 4°C. Серию CYP51A1-зависимых электрокаталитических реакций проводили с помощью потенциостата μ AUTOLAB III (Metrohm Autolab, Нидерланды) с программным обеспечением GPES 4.9.7. Исследование электрокаталитической активности CYP51A1 проводилось амперометрическим методом в аэробных условиях в 1 мл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl и 1% этанола по объёму, при фиксированном потенциале рабочего электрода -600 мВ (отн. Ag/AgCl) и постоянном перемешивании. Титрование проводили раствором абиратерона или галетерона в этаноле после достижения стационарного значения тока. В случае титрования в присутствии ингибитора CYP51A1 инкубационная смесь содержала 1 мкМ кетоконазол. Амперометрический отклик CYP51A1 на добавку этанола вычитали из изменения восстановительного тока фермента при титровании растворами абиратерона или галетерона в этаноле. Кинетические параметры CYP51A1 по отношению к абиратерону были получены путём нелинейной регрессии с помощью программного обеспечения OriginPro 7.5.

С целью анализа продуктов CYP51A1-зависимых электрокаталитических реакций по отношению к абиратерону и галетерону электрокаталитические реакции проводили с помощью электрохимической системы на основе CYP51A1 при фиксированном потенциале рабочего электрода -600 мВ (отн. Ag/AgCl) в течение 30 минут в 1 мл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% этанола и 50 мкМ абиратерон или 50 мкМ галетерон. Электрокаталитические реакции проводили при постоянном

перемешивании с помощью магнитной мешалки. В качестве контроля электрокаталитические реакции при тех же условиях проводили с помощью безферментного электрода, модифицированного ДДАБ.

Анализ продуктов электрокаталитических реакций проводился методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF). 2,5-дигидробензойная кислота (матрица) была разведена с помощью раствора, содержащего 50% ацетонитрила и 0,5% трифторуксусной кислоты, до концентрации 10 мг/мл. После электрокаталитической реакции инкубационную смесь (1 мкл) наносили на MALDI-колонку с последующим добавлением 1 мкл матрицы. Образцы кристаллизовали путём испарения растворителя при комнатной температуре в течение 10 минут. Масс-спектры получены с помощью масс-спектрометра Bruker Daltonics Ultraflex TOF/TOF, снабжённого LIFT-MS/MS. Спектры были получены в положительном рефлектронном режиме. Интенсивность лазера была настроена примерно на 3% выше линии шума. Сигналы от 200-500 ударов были суммированы для каждого масс-спектра.

Исследование ингибиторной активности D4A и D4G по отношению к CYP19A1.

Кинетический анализ с целью определения ингибиторной активности D4A и D4G по отношению к CYP19A1 проводился с помощью реконструированной ферментной системы. 113,8 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 20% глицерина и 13 мМ 1,2-дидодеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, были обработаны с помощью ультразвуковой бани Elmasonic S10H (Elma, Германия) в течение 5 минут при температуре 35°C. После обработки в полученный раствор были добавлены 10 мкл 15 мМ MgCl₂, 1 мкл 86 мкМ рекомбинантного цитохрома CYP19A1 человека, 2,2 мкл 77 мкМ рекомбинантной NADPH-зависимой цитохром P450 редуктазы крысы, 10 мкл 75 мМ глюкозо-6-фосфата, 1 мкл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 1 мкл D4A (конечная концентрация в 0,03-50 мкМ) в метаноле или 1 мкл D4G (конечная концентрация в системе 50 мкМ) в метаноле или 1 мкл метанола в качестве контроля и 1 мкл андростендиона (конечная концентрация в системе 5 мкМ) или 1 мкл тестостерона (конечная концентрация в системе 21 мкМ) в метаноле. Каталитическая реакция была инициирована путём внесения в систему 10 мкл 75 мМ NADPH, и дальнейшая инкубация проводилась при температуре 37°C и постоянном перемешивании (700 rpm) с помощью термошейкера TS-100C (Biosan, Латвия) в течение 30 минут. Для остановки реакции и экстракции стероидных продуктов 300 мкл хлороформа вносились в инкубационную смесь с последующим центрифугированием в течение 5 минут при 12100 × g с помощью микроцентрифуги Minispin (Eppendorf, Германия). Процедура экстракции повторялась дважды. После центрифугирования нижняя органическая фаза отбиралась и упаривалась при температуре 58°C под потоком аргона. Упаренные образцы растворялись в 20 мкл этанола и наносились на алюминиевые пластины для тонкослойной хроматографии с силикагелем с флуоресцентным реагентом (TLC Silica gel 60, F₂₅₄, Merk, Германия). В качестве контроля на пластины также наносились по 1 мкл 10 мМ андростендиона, 10 мМ эстрона или 10 мМ β-эстрадиола и 10 мМ D4A в метаноле. Хроматография осуществлялась с помощью подвижной фазы, состоящей из смеси хлороформа и этилацетата (3:1 по объёму), в стеклянной камере. После хроматографии пластины высушивали при комнатной температуре и далее для улучшения визуализации стероидных соединений пластины помещали в эксикатор, насыщенный парами йода, на 2 минуты. Визуализация стероидных соединений на хроматографической пластине осуществлялась с помощью ультрафиолетовой лампы (Vilber Lourmat, Франция) при длине волны 254 нм. Пятна на хроматографической пластине, соответствующие эстрону или β-эстрадиолу, изолировали и далее элюировали 200 мкл этанола. Частицы силикагеля осаждали на дно пробирки с помощью центрифугирования в течение 5 минут при 12100 × g. Концентрацию эстрона в надосадочной жидкости определяли спектрофотометрически в кварцевых микрокуветах объёмом 50 мкл при длине волны 282 нм по калибровочной зависимости оптической плотности от концентрации эстрона в стандартных образцах. Для построения калибровочной зависимости эстрон или β-эстрадиол добавлялся в 100 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), содержащий 20% глицерина, далее экстрагировался и

хроматографировался из упаренных образцов аналогично вышеописанной методике. Активность CYP19A1 выражалась в количестве эстрона или β -эстрадиола в нмоль, образующегося в реконструированной системе за 1 минуту 1 нмоль фермента. Обработка данных проводилась с помощью программного обеспечения Origin 8.1. Все эксперименты повторялись не менее трёх раз.

Исследование кортизол-гидроксилазной активности CYP3A4 в присутствии абиратерона. Определение каталитической активности CYP3A4 по отношению к глюкокортикоидному гормону – кортизолу – проводилось с помощью флуоресцентного анализа производного продукта CYP3A4-зависимой электрокаталитической реакции. Ферментные электроды были приготовлены по аналогичной методике, описанной выше для CYP51A1, при этом на модифицированный рабочий электрод наносился 1 мкл 131 мкМ CYP3A4. Серию CYP3A4-зависимых электрокаталитических реакций проводили с помощью потенциостата μ AUTOLAB III (Metrohm Autolab, Нидерланды) с программным обеспечением GPES 4.9.7. Время электрокаталитической реакции от 5 до 60 минут, потенциал рабочего электрода -600 мВ (отн. Ag/AgCl), электрохимическая ячейка объёмом 300 мкл содержала 100 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), 50 мМ NaCl, 1% метанола по объёму и 5; 10; 15; 17,5; 30; 50 или 100 мкМ кортизол. В качестве контроля проводились электрокаталитические реакции с использованием электрода, модифицированного ДДАБ, без фермента в присутствии 100 мкМ кортизола в течение 60 минут. После проведения CYP3A4-зависимой электрокаталитической реакции реакционная смесь смешивалась с двойным объёмом раствора серной кислоты и этанола (3:1) и инкубировалась 10 минут при комнатной температуре, после чего регистрировался спектр флуоресценции при длине волны возбуждения 365 нм и диапазоне длин волн эмиссии 400-600 нм в кварцевой кювете объёмом 350 мкл. Для исследования влияния абиратерона на кортизол-гидроксилазную активность CYP3A4 электрокаталитическая реакция проводилась при тех же условиях, но в присутствии различных концентраций абиратерона или кетоконазола (от $1 \cdot 10^{-9}$ до $5 \cdot 10^{-5}$ М) в электрохимической системе, при этом ферментный электрод предварительно инкубировался в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 0,5% метанола по объёму, 0,5% этанола по объёму и различные концентрации абиратерона или кетоконазола (от $1 \cdot 10^{-9}$ до $5 \cdot 10^{-5}$ М). Активность CYP3A4 выражалась в нмоль образовавшегося в процессе электрокаталитической реакции 6 β -гидроксикортизола за 1 минуту 1 нмоль фермента.

Определение электрокаталитической монооксигеназной активности CYP3A4 по отношению к галетерону. Ферментные электроды помещались в электрохимическую ячейку объёмом 300 мкл, заполненную 100 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 50 мМ NaCl, 0,5% метанола по объёму, 0,5% этанола по объёму и 50 мкМ галетерона. Электрокаталитические реакции проводились в течение 20 минут при фиксированном значении потенциала рабочего электрода -600 мВ (отн. Ag/AgCl) и температуре $22 \pm 3^\circ\text{C}$ в условиях постоянного перемешивания с помощью магнитной мешалки. После проведения реакции в инкубационную смесь добавлялся двойной объём хлороформа, полученная смесь центрифугировалась в течение 10 минут при 13400 rpm ($12100 \times g$) с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия). После центрифугирования нижняя фаза отбиралась в вialу, и растворитель упаривался при 58°C под потоком аргона. Экстракция проводилась дважды для каждого из образцов. Упаренные образцы растворялись в смеси ацетонитрил:вода 1:1 и анализировались методом масс-спектрометрии в положительном режиме с помощью FTICR MS ApexUltra (Bruker, Германия). Образцы вводились в источник электроспрейной ионизации при потоке 1,5 мкл/мин с потоком распыляющего газа 2,5 л/мин. Температура входного капилляра – 200°C , поток сухого газа – 3,5 л/мин, ионизирующий потенциал – 3,6 кВ. После каждого измерения капилляр электроспрейной ионизации промывался смесью ацетонитрил:вода (4:1) в течение 30 минут для предотвращения переноса образцов. Масс-спектры визуализировались с помощью программного обеспечения DataAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование взаимодействий абиратерона, D4A, галетерона и D4G с активными центрами ферментов методом абсорбционной спектроскопии

Известно, что лиганды I типа при формировании комплекса с соответствующим изоферментом цитохрома P450 вызывают переход иона железа гема фермента из низкоспинового состояния в высокоспиновое, что можно зарегистрировать по сдвигу поглощения абсолютного спектра в коротковолновую область (гипсохромному сдвигу) и соответствующим изменениям в дифференциальных спектрах цитохрома P450 с максимумом поглощения при длине волны около 390 нм и минимумом поглощения при длине волны около 420 нм (Luthra A. et al., 2011). Лиганды II типа вызывают переход иона железа гема из высокоспинового состояния в низкоспиновое, при этом соответствующие спектральные изменения можно зарегистрировать по сдвигу поглощения абсолютного спектра в длинноволновую область (батохромному сдвигу) цитохрома P450 и изменениям в дифференциальных спектрах с характеристическим максимумом поглощения при длине волны около 425-440 нм и минимумом – около 415 нм или меньше (Luthra A. et al., 2011). Как правило, субстраты цитохромов P450 являются лигандами I типа, а ингибиторы – II типа, поэтому часто спектральные изменения, вызываемые лигандами I типа, называют изменениями по субстратному типу, а вызываемые лигандами II типа – по ингибиторному типу.

Абсорбционная спектроскопия позволяет рассчитать параметры образования комплексов лигандов с изоферментами цитохрома P450 – спектральную константу диссоциации (K_S) и максимальную разность поглощений при максимуме и минимуме в дифференциальных спектрах ($\Delta A_{\max}$) по уравнению (1) (Garrido M. et al., 2014):

$$\Delta A = \frac{\Delta A_{\max}[L]}{K_S + [L]} \quad (1)$$

где ΔA – разность поглощений при максимуме и минимуме в дифференциальных спектрах; $\Delta A_{\max}$ – максимальная разность поглощений при максимуме и минимуме в дифференциальных спектрах; K_S – спектральная константа диссоциации, М; $[L]$ – концентрация лиганда, М.

В случае сигмоидной зависимости разности поглощений при максимуме и минимуме в дифференциальных спектрах от концентрации лиганда для расчёта кинетических параметров образования комплексов лигандов с изоферментами цитохрома P450 применяется уравнение (2) (Isin E.M. and Guengerich F.P., 2006):

$$\Delta A = \frac{\Delta A_{\max}[L]^h}{K_{S0,5}^h + [L]^h} \quad (2)$$

где $K_{S0,5}$ – спектральная константа диссоциации, М; h – коэффициент Хилла.

Для сравнения эффективности связывания лигандов с ферментом рассчитывается отношение максимальной разности поглощений при максимуме и минимуме в дифференциальных спектрах к спектральной константе диссоциации ($\Delta A_{\max}/K_S$) (Shimada T. et al., 2013).

Для выявления возможных взаимодействий исследуемых соединений с активными центрами цитохромов P450, катализирующих ключевые стадии стероидогенеза, был использован метод абсорбционной спектроскопии. Результаты суммированы в таблице 1.

Таблица 1. Спектральные характеристики взаимодействий изоферментов цитохрома P450 и лигандов

СYP + лиганд	Тип дифференциального спектра	$\Delta A_{\max}$	Характер зависимости ΔA от концентрации лиганда	Коэффициент Хилла (h)	K_S , мкМ	$\Delta A_{\max}/K_S$, мкМ ⁻¹
СYP21A2 + Абиратерон*	II	Нет данных	Гиперболический	-	$6,3 \pm 0,2$	Нет данных
СYP21A2 + D4A	II	$0,25 \pm 0,01$	Гиперболический	-	$3,4 \pm 0,5$	$0,075 \pm 0,015$
СYP21A2 + Галетерон	I	$0,102 \pm 0,006$	Гиперболический	-	$3,1 \pm 0,7$	$0,035 \pm 0,010$
СYP21A2 + D4G	I	$0,059 \pm 0,002$	Гиперболический	-	$4,6 \pm 0,4$	$0,013 \pm 0,002$
СYP51A1 + Абиратерон	I	$0,106 \pm 0,002$	Сигмоидный	$2,4 \pm 0,2$	22 ± 1	$0,005 \pm 0,001$
СYP51A1 + D4A	I	$0,062 \pm 0,004$	Сигмоидный	$1,8 \pm 0,3$	$1 \pm 0,1$	$0,060 \pm 0,013$
СYP51A1 + Галетерон	I	$0,109 \pm 0,006$	Сигмоидный	$1,97 \pm 0,23$	16 ± 1	$0,057 \pm 0,010$
СYP51A1 + D4G	I	$0,077 \pm 0,002$	Гиперболический	-	$5,4 \pm 0,3$	$0,014 \pm 0,001$
СYP11A1 + Абиратерон	II	$0,146 \pm 0,005$	Гиперболический	-	$0,7 \pm 0,07$	$0,212 \pm 0,029$
СYP11A1 + D4A	Спектральные изменения не регистрируются					
СYP11A1 + Галетерон	Спектральные изменения не регистрируются					
СYP11A1 + D4G	Спектральные изменения не регистрируются					
СYP19A1 + Абиратерон	Спектральные изменения не регистрируются					
СYP19A1 + D4A	II	$0,081 \pm 0,004$	Сигмоидный	$2 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,04$	$0,142 \pm 0,015$
СYP19A1 + Галетерон	Спектральные изменения не регистрируются					
СYP19A1 + D4G	Спектральные изменения не регистрируются					
СYP3A4 + Абиратерон	II	$0,175 \pm 0,003$	Сигмоидный	$2,3 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,1$	$0,046 \pm 0,002$
СYP3A4 + D4A	II	$0,227 \pm 0,007$	Сигмоидный	$1,5 \pm 0,05$	$3,7 \pm 0,2$	$0,061 \pm 0,006$
СYP3A4 + Галетерон	II	$0,12 \pm 0,01$	Гиперболический	-	$7,5 \pm 1,7$	$0,017 \pm 0,005$
СYP3A4 + D4G	Спектральные изменения не определялись					

* По данным литературы (Malikova J. et al., 2017).

Представлены средние значения $\pm$ стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

2. Исследование субстрат-ингибиторных свойств D4A, галетерона и D4G по отношению к CYP21A2

Основываясь на данных спектрального анализа, можно предположить, что D4A является ингибитором CYP21A2. Для проверки этой гипотезы был проведён анализ ингибиторной активности D4A по отношению к прогестерон-гидроксилазной активности CYP21A2 в диапазоне концентраций прогестерона 7,5-12,5 мкМ при различных концентрациях D4A в системе (0-5 мкМ) с помощью реконструированной CYP21A2-содержащей системы. Продукты реакции были разделены с помощью тонкослойной хроматографии, визуализированы при длине волны 254 нм и количественно проанализированы с помощью спектрофотометрического определения при длине волны 240 нм. Анализ ингибиторной активности проводился с помощью метода Диксона. Зависимости обратных начальных скоростей CYP21A2-зависимого 21-гидроксилирования прогестерона ($1/V$) от концентраций D4A были линейны и имели точку пересечения во втором квадранте плоскости координат (рис. 1), что указывает на конкурентный или смешанный тип ингибирования (Dixon M., 1953).

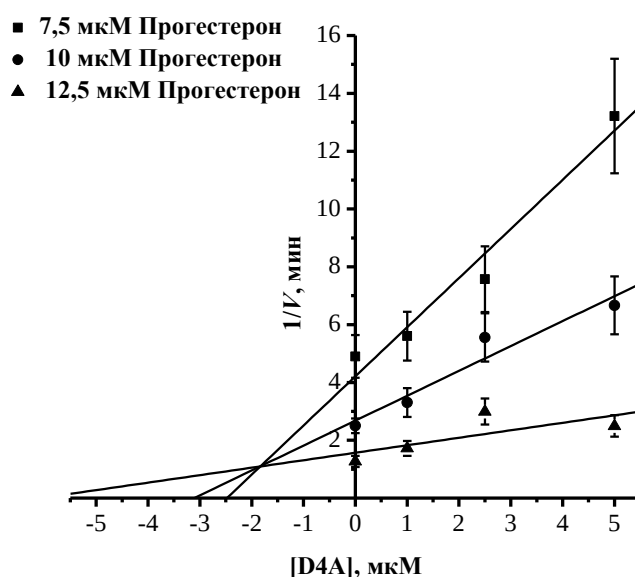


Рис. 1. Зависимости обратных начальных скоростей CYP21A2-зависимого 21-гидроксилирования прогестерона ($1/V$) от концентраций D4A. Представлены средние значения $\pm$ стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Константа ингибирования D4A по отношению к CYP21A2 была определена как отрицательная проекция точки пересечения линейных зависимостей на ось X, соответствующая концентрации D4A, и составила $1,8 \pm 0,8$ мкМ, что схоже со значением константы ингибирования абиратерона по отношению к CYP21A2-зависимому 21-гидроксилированию 17 α -гидроксипрогестерона (2,26 мкМ (Malikova J. et al., 2017)).

Проявление галетероном и D4G субстратных свойств по отношению к CYP21A2, предположенных на основании результатов дифференциальной абсорбционной спектроскопии, было исследовано с помощью реконструированной монооксигеназной системы. Методом масс-спектрометрии с ионизацией распылением в электрическом поле не выявлено продуктов CYP21A2-зависимого окисления галетерона или D4G при их инкубации в течение 30 минут в реконструированной монооксигеназной системе. Полученные таким образом данные свидетельствуют либо об отсутствии субстратных свойств галетерона и D4G по отношению к CYP21A2, либо их крайне медленной биотрансформации при участии этого изофермента цитохрома P450.

Анализ ингибиторной активности галетерона и D4G по отношению к прогестерон-гидроксилазной активности CYP21A2 был проведён с помощью реконструированной монооксигеназной системы. На рисунке 2 представлены зависимости начальных скоростей

СУР21А2-зависимого 21-гидроксилирования прогестерона (V) от концентрации прогестерона (0-100 мкМ) при различных концентрациях галетерона (А) и D4G (Б).

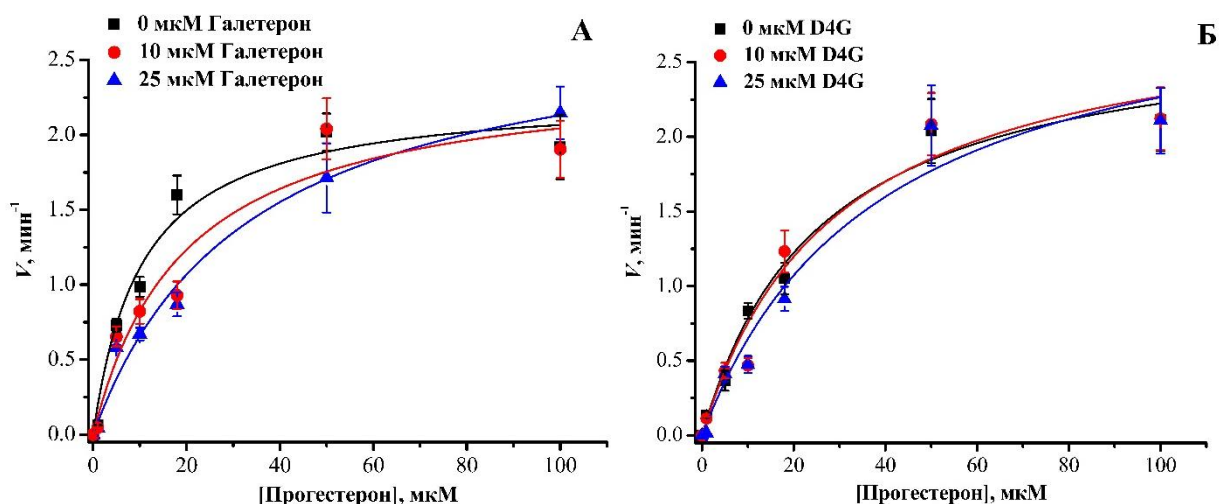


Рис. 2. Зависимости начальных скоростей СУР21А2-зависимого 21-гидроксилирования прогестерона (V) от концентрации прогестерона (0-100 мкМ) в присутствии различных концентраций галетерона (А) или D4G (Б): 0 мкМ (■), 10 мкМ (●), 25 мкМ (▲). Представлены средние значения $\pm$ стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Галетерон проявлял ингибиторную активность по отношению к СУР21А2, в отличие от D4G. В отсутствие галетерона значения максимальной скорости реакции ($V_{\max}$) и константы Михаэлиса (K_M) составили $2,3 \pm 0,2 \text{ мин}^{-1}$ и $11 \pm 3 \text{ мкМ}$, соответственно. При концентрации галетерона 10 мкМ в системе $V_{\max}$ практически не менялась ($2,4 \pm 0,3 \text{ мин}^{-1}$), тогда как значение K_M увеличилось до $20 \pm 7 \text{ мкМ}$. При концентрации галетерона 25 мкМ в системе значение $V_{\max}$ составило $2,8 \pm 0,3 \text{ мин}^{-1}$, тогда как значение K_M возросло до $33 \pm 7 \text{ мкМ}$. Таким образом, на основании полученных кинетических зависимостей начальных скоростей реакции от концентрации прогестерона при различных концентрациях галетерона (0-25 мкМ) и изменений кинетических параметров, было показано, что галетерон проявляет свойства конкурентного ингибитора по отношению к СУР21А2. Значение константы ингибирования (K_i) галетерона по отношению к СУР21А2 было рассчитано как $12 \pm 3 \text{ мкМ}$.

Таким образом, можно заключить, что абиратерон, D4A и галетерон ингибируют 21-гидроксилазную активность СУР21А2 по отношению к прогестерону, тогда как D4G в диапазоне концентраций 0-25 мкМ не проявляет ингибиторных свойств по отношению к данному ферменту. Сравнение констант ингибирования абиратерона, D4A и галетерона по отношению к СУР21А2 позволяет предположить более сильное ингибирование фермента абиратероном и D4A, по сравнению с галетероном, что, в свою очередь, может указывать на более высокую вероятность клинических проявлений ингибирования СУР21А2 в виде усиления основного побочного эффекта абиратерона – нарушения метаболизма кортикостероидов – при применении абиратерона и стратегии накопления D4A у пациентов для лечения рака предстательной железы, чем в случае применения галетерона и стратегии накопления D4G в организмах пациентов.

3. Исследование субстратных свойств абиратерона и галетерона по отношению к CYP51A1

Электрохимические системы на основе изоферментов цитохрома P450 широко используются для исследования субстрат-ингибиторного потенциала различных соединений по отношению к представителям этого суперсемейства, при этом не требуется реконструирования электрон-транспортной цепи в виде восстановительных коферментов и редокс-партнёрных белков, а цитохром P450-зависимая электрокаталитическая реакция инициируется благодаря электронам, поступающим от электрода (Schneider E. and Clark D.S., 2013; Kuzikov A.V. et al., 2014; Шумянцева В.В. и соавт., 2004; Шумянцева В.В. и соавт., 2011). В данной работе были использованы электрохимические системы на основе изоферментов цитохрома P450 для оценки кинетических параметров электрокаталитических реакций по отношению к предполагаемым субстратам в условиях отсутствия точной информации о физико-химических свойствах продуктов реакций.

Для исследования возможного окисления абиратерона и галетерона, катализируемого CYP51A1, была разработана электрохимическая система на основе рекомбинантного человеческого CYP51A1, иммобилизованного на печатном графитовом электроде с помощью дидодецилдиметиламмония бромида (ДДАБ). Электрохимические параметры CYP51A1 были исследованы с помощью циклической вольтамперометрии при разных скоростях сканирования в электрохимической ячейке, заполненной насыщенным аргоном 100 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 50 мМ NaCl.

На циклических вольтамперограммах иммобилизованного на электроде фермента наблюдались два пика: катодный с потенциалом (E_c) -380 ± 6 мВ (отн. Ag/AgCl) и анодный с потенциалом (E_a) -210 ± 16 мВ (отн. Ag/AgCl). Полупотенциал ($E^{0'} = (E_c + E_a)/2$) CYP51A1 был рассчитан как -295 ± 22 мВ (отн. Ag/AgCl). Амплитуды пиков гемопротеина линейно зависели от скорости сканирования (v) в диапазоне от 10 мВ/с до 100 мВ/с, что указывает на протекание электрохимического процесса на поверхности электрода (Bard A.J., 1984). Поверхностная концентрация электроактивного CYP51A1 (Γ_0) на электроде была рассчитана путём интегрирования восстановительного пика, полученного с помощью циклической вольтамперометрии (Bartlett P.N., 2008) как $(1,72 \pm 0,15) \cdot 10^{-11}$ моль/см².

Константа скорости переноса электронов (k_s) между иммобилизованным CYP51A1 и печатным графитовым электродом, модифицированным ДДАБ, была рассчитана по методу Лавирона (Laviron E., 1979) для поверхностно-контролируемого электрохимического процесса в случае $n\Delta E_p < 200$ мВ, где n – количество электронов, участвующих в электрохимическом процессе (для иона железа гема $n = 1$), ΔE_p – разность между потенциалами пиков восстановления и окисления (мВ) как $0,37 \pm 0,05$ с⁻¹ при скорости сканирования 100 мВ/с. Коэффициент переноса электронов (α) был рассчитан как 0,6 из зависимости ($E_p - E^{0'}$) от $\ln(v)$.

Разработанная электрохимическая система была использована для оценки кинетических параметров CYP51A1-зависимых электрокаталитических реакций по отношению к абиратерону и галетерону с помощью амперометрического титрования при фиксированном потенциале рабочего электрода -600 мВ (отн. Ag/AgCl). При титровании абиратероном наблюдался амперометрический отклик CYP51A1, при этом в присутствии 1 мкМ кетоконазола как ингибитора CYP51A1 в системе наблюдались меньшие значения каталитического тока по отношению к абиратерону. Галетерон вызывал незначительные изменения восстановительного тока CYP51A1, по сравнению с добавками соответствующего объёма этанола как контроля. Данные хроноамперометрических титрований представлены на рисунке 3.

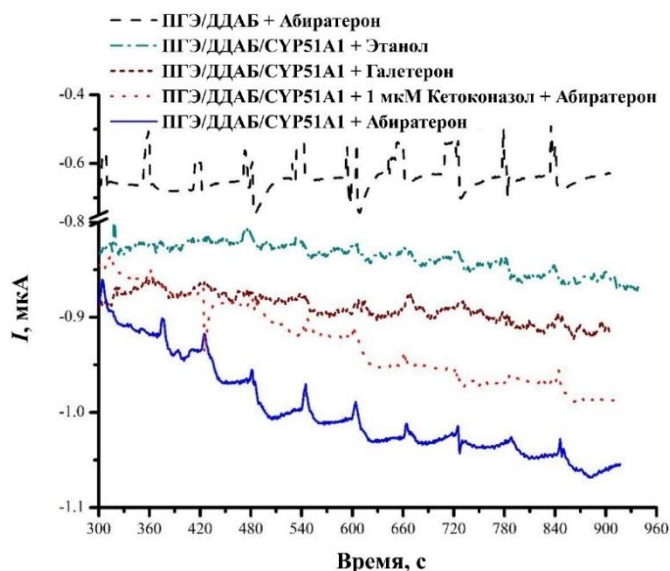


Рис. 3. Амперометрические отклики CYP51A1 при фиксированном потенциале рабочего электрода -600 мВ (отн. Ag/AgCl) в 1 мл 100 мМ калий-фосфатном буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, в ответ на добавки абиратерона (10 мкл 1 мМ раствора в этаноле, —) в отсутствие кетоконазола или при содержании 1 мкМ кетоконазола в системе (•••) или в ответ на добавки галактерона (10 мкл 1 мМ раствора в этаноле, - - -) или этанола (10 мкл, - • - •) каждые 60 секунд. Амперометрический ответ ПГЭ, модифицированного ДДАБ, на добавки абиратерона (— —) приведён в качестве контроля.

Как и в случае исследования взаимодействия абиратерона с активным центром CYP51A1 с помощью абсорбционной спектроскопии, зависимость каталитического тока ($I_{\text{кат}}$) от концентрации абиратерона носила сигмоидный характер ($R^2 = 0,988$). В присутствии 1 мкМ кетоконазола в системе сигмоидный характер зависимости ($R^2 = 0,994$) был более выраженным (рис. 4).

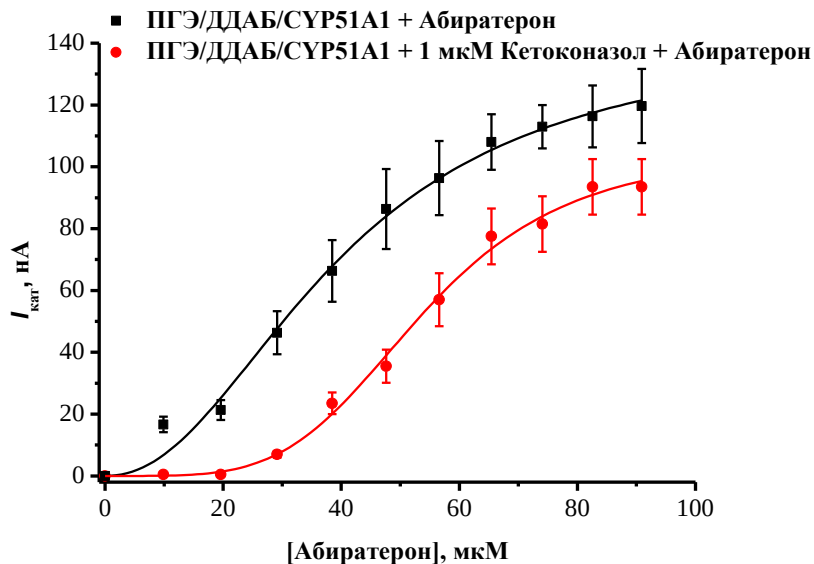


Рис. 4. Зависимости каталитического тока CYP51A1, иммобилизованного на модифицированном ДДАБ ПГЭ, от концентрации абиратерона в отсутствие (■) или в присутствии 1 мкМ кетоконазола (•) в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, полученные методом нелинейной регрессии. Представлены средние значения $\pm$ стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Параметры сигмоидных зависимостей каталитического тока СУР51А1 от концентрации абиратерона были рассчитаны с помощью метода нелинейной регрессии, в соответствии с моделью уравнения Хилла. Электрохимическая форма уравнения Хилла может быть представлена как (3):

$$I_{\text{кат}} = \frac{I_{\text{кат макс}}[S]^h}{(K_{0,5})^h + [S]^h} \quad (3)$$

где $I_{\text{кат}}$ – каталитический ток (А), $I_{\text{кат макс}}$ – максимальный каталитический ток (А), $[S]$ – концентрация субстрата (мкМ), h – коэффициент Хилла, $K_{0,5}$ – концентрация субстрата, при которой каталитический ток равен половине максимального (мкМ).

$I_{\text{кат макс}}$ СУР51А1, иммобилизованного на модифицированном ДДАБ ПГЭ, в присутствии насыщающей концентрации абиратерона был рассчитан как 143 ± 11 нА, $K_{0,5}$ – как 40 ± 4 мкМ, h – как $2,1 \pm 0,3$. В присутствии 1 мкМ кетоконазола эти параметры составили 106 ± 6 нА, 54 ± 2 мкМ и $4,3 \pm 0,4$, соответственно.

Для подтверждения предполагаемых субстратных свойств абиратерона и галетерона по отношению к СУР51А1 были также проведены электрокаталитические реакции по отношению к 50 мкМ абиратерону или 50 мкМ галетерону в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и 1% этанола, в течение 30 минут при потенциале рабочего электрода -600 мВ (отн. Ag/AgCl) и постоянном перемешивании с использованием ПГЭ, модифицированных ДДАБ, с иммобилизованным на их поверхности СУР51А1. Контрольные эксперименты проводились при тех же параметрах с использованием модифицированных ДДАБ ПГЭ без иммобилизованного на их поверхности фермента.

После электрокаталитических реакций инкубационные смеси были проанализированы с помощью масс-спектрометрии (MALDI-TOF) с целью выявления продуктов предполагаемого СУР51А1-зависимого моногидроксилирования абиратерона или галетерона. В случае использования абиратерона в качестве потенциального субстрата СУР51А1 выявлены пики со значением m/z 350,5, соответствующие абиратерону (расчётное значение m/z 350,2 ($[C_{24}H_{32}NO + H^+]$)), а также пики со значением m/z 366,3, соответствующие продукту моногидроксилирования абиратерона (расчётное значение m/z 366,2 ($[C_{24}H_{32}NO_2 + H^+]$)) в смесях до и после как ферментативной, так и неферментативной электрокаталитических реакций. Отношения интенсивностей пиков со значением m/z 366,3 к интенсивностям пиков со значением m/z 350,5 для образцов после неферментативной и ферментативной электрокаталитических реакций были определены как 0,03 и 0,07, соответственно, что указывает на возможное моногидроксилирование абиратерона под действием СУР51А1.

В случае использования галетерона в качестве потенциального субстрата СУР51А1 были обнаружены пики со значением m/z 389,2, соответствующие галетерону (расчётное значение m/z 389,3 ($[C_{26}H_{33}N_2O + H^+]$)), во всех образцах, в то время как пики со значением m/z 405,2, соответствующие продукту моногидроксилирования галетерона (расчётное значение m/z 405,2 ($[C_{26}H_{33}N_2O_2 + H^+]$)), были обнаружены только в образцах после ферментативной электрокаталитической реакции, что указывает на вклад СУР51А1 в окисление галетерона.

Таким образом, можно заключить, что абиратерон и галетерон проявляют субстратные свойства по отношению к СУР51А1 и способны подвергаться моногидроксилированию под действием этого фермента, что может приводить к образованию метаболитов с изменённой фармакологической активностью при приёме этих соединений в качестве лекарственных препаратов для лечения рака предстательной железы.

4. Исследование ингибиторной активности D4A и D4G по отношению к CYP19A1

Поскольку в результате спектрального исследования было обнаружено связывание D4A с активным центром CYP19A1, была проведена оценка ингибиторных свойств D4A по отношению к этому ферменту.

С помощью реконструированной ферментной системы была оценена ингибиторная активность D4A (в диапазоне концентраций 0,03-50 мкМ) по отношению к CYP19A1. Поскольку абсорбционная спектроскопия выявила связывание D4A с активным центром свободного от субстрата CYP19A1, был исключён бесконкурентный тип ингибирования. Предположение о конкурентном типе ингибирования было проверено с помощью использования значительно превышающей K_M концентрации субстратов, при которой в присутствии конкурентного ингибитора скорость ферментативной реакции меняется незначительно. В качестве субстрата CYP19A1 был использован андростендион при концентрации 5 мкМ, что более чем в сто раз превышает установленное ранее значение константы Михаэлиса (Sohl C.D. and Guengerich F.P., 2010). При данных условиях активность CYP19A1 по отношению к андростендиону была определена как $0,26 \pm 0,08$ мин⁻¹. В присутствии 1 мкМ D4A наблюдалось уменьшение активности фермента до $0,21 \pm 0,07$ мин⁻¹, а в присутствии 10 мкМ D4A активность CYP19A1 уменьшалась примерно в 2 раза (до $0,12 \pm 0,02$ мин⁻¹). При увеличении концентрации D4A до 50 мкМ остаточная активность фермента сохранялась на уровне 50%. Поскольку D4A значительно изменял скорость ферментативной реакции по отношению к концентрации субстрата, превышающей K_M в сто раз, было исключено предположение о конкурентном типе ингибирования. На рисунке 5 представлена зависимость активности CYP19A1 (%) по отношению к андростендиону от концентрации D4A.

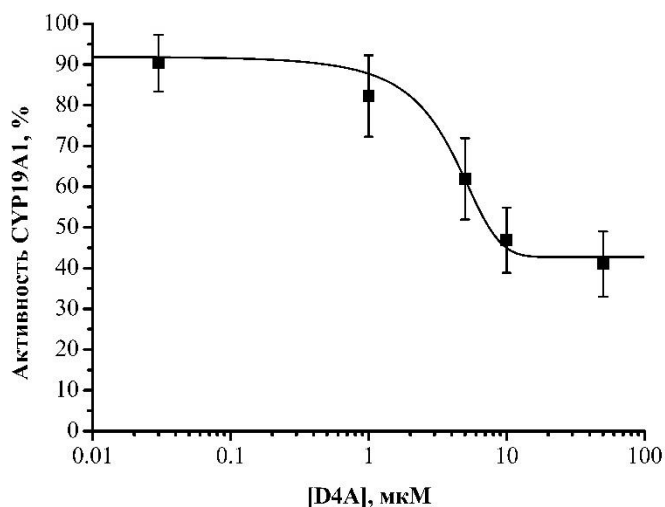


Рис. 5. Зависимость активности CYP19A1 (%) по отношению к андростендиону (5 мкМ) в присутствии различных концентраций D4A (0-50 мкМ). Представлены средние значения $\pm$ стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Из зависимости, представленной на рисунке 5, было определено значение концентрации D4A, при которой активность CYP19A1 по отношению к 5 мкМ андростендиону уменьшалась вдвое (IC_{50}), которое составило $7,5 \pm 1,1$ мкМ. Поскольку IC_{50} значительно отличается от установленного значения K_S ($0,6 \pm 0,04$ мкМ), было предположено, что наиболее вероятным типом ингибирования D4A по отношению к CYP19A1 является смешанный. Также была исследована способность D4A ингибировать активность CYP19A1 по отношению к 21 мкМ тестостерону (концентрация, превышающая значение K_M в 100 раз (Kellis J.T. Jr. and Vickery L.E., 1987)). В присутствии 50 мкМ D4A активность CYP19A1 по отношению к 21 мкМ тестостерону уменьшалась до 43% (с $0,71 \pm 0,27$ мин⁻¹ до $0,31 \pm 0,12$ мин⁻¹).

Несмотря на отсутствие спектральных изменений CYP19A1 при титровании D4G, была исследована ингибиторная активность этого соединения по отношению к ферменту. Как и ожидалось, D4G при концентрации 50 мкМ, в отличие от D4A, практически не изменял активность CYP19A1, что согласуется с данными спектрального анализа.

Таким образом, фармакологически активный метаболит абиратерона D4A ингибирует ключевой фермент биосинтеза эстрогенов – CYP19A1, в отличие от абиратерона, галетерона и его фармакологически активного метаболита D4G. Поскольку D4A ингибирует CYP17A1, что приводит к снижению уровня андрогенов, а также подавляет активность CYP19A1, можно предположить, что стратегия аккумулялирования D4A в организме пациентов с целью повышения эффективности фармакотерапии рака предстательной железы может приводить к снижению биосинтеза эстрогенов. Снижение уровня эстрогенов оказывает сильное влияние на продукцию лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов гипофиза, способствуя выработке тестостерона (Raven G. et al., 2006; T'Sjoen G.G. et al., 2005). Принимая во внимание ингибирующий эффект абиратерона и D4A по отношению к основным ферментам пути биосинтеза андрогенов из холестерина, можно предположить, что вероятность повышения продукции тестостерона за счёт ингибирования CYP19A1 D4A относительно мала. С другой стороны, вероятное снижение уровня эстрогенов как следствие фармакотерапии абиратероном и ингибиторами стероид 5 α -редуктазы с целью аккумулялирования D4A может приводить к побочным эффектам, таким как повышение костной резорбции, снижение памяти и нарушения углеводного и липидного обменов (Freedland S.J. et al., 2009; Hammes S.R. and Levin E.R., 2019).

5. Исследование кортизол-гидроксилазной активности CYP3A4 в присутствии абиратерона

CYP3A4 катализирует 6 β -гидроксилирование кортизола. Соотношение концентрации субстрата этой реакции к концентрации продукта в биологических жидкостях используется для оценки активности фермента *in vivo* (Nozaki O. et al., 1992; Barrett Y.C. et al., 2005). Кортизол также используется как маркерный субстрат при определении каталитической активности CYP3A4 в модельных системах (Peng C.C. et al., 2011). Изменение CYP3A4-зависимого метаболизма стероидных гормонов может сказаться на прогрессии рака предстательной железы, особенно в случае наличия мутантных форм рецептора андрогенов в клетках опухоли.

Для исследования влияния абиратерона на CYP3A4-зависимое гидроксилирование кортизола как маркерного субстрата, обладающего стероидной структурой, использовался подход, основанный на флуориметрическом определении субстрата и продукта реакции (кортизола и 6 β -гидрокортизола, соответственно) после обработки смесью серной кислоты:этанола (3:1). Стандартные растворы 100 мкМ кортизола и 100 мкМ 6 β -гидрокортизола в 300 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl и 1% метанола по объёму, были обработаны двойным объёмом смеси серной кислоты:этанола (3:1) и инкубировались в течение 10 минут при комнатной температуре. Спектры флуоресценции полученных растворов были измерены при длине волны возбуждения 365 нм в диапазоне длин волн эмиссии 400-600 нм. Было установлено, что пик эмиссии при длине волны 525 $\pm$ 2 нм соответствует кортизолу, а при длине волны 427 $\pm$ 2 нм – 6 β -гидрокортизолу. Зависимость интенсивности флуоресценции при длине волны 427 нм от концентрации 6 β -гидрокортизола была линейна в диапазоне от 1 до 10 мкМ и подчинялась уравнению $y = 2,0828x$ с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,995$. Диапазон концентраций 6 β -гидрокортизола соответствует 300-3000 пмоль вещества в 300 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl и 1% метанола по объёму, что было в дальнейшем использовано для расчёта скорости электрокаталитической гидроксилазной активности CYP3A4 по отношению к кортизолу.

Для анализа гидроксилазной активности СУР3А4 по отношению к кортизолу была использована электрохимическая система на основе СУР3А4, иммобилизованного на модифицированном ДДАБ ПГЭ. Начальные скорости 6 β -гидроксилирования кортизола под действием СУР3А4 при концентрациях субстрата 5; 10; 15; 17,5; 30; 50 или 100 мкМ в электрохимической системе были рассчитаны из зависимостей количества образовавшегося 6 β -гидроксикортизола от времени электрокаталитической реакции. Была получена гиперболическая зависимость скорости электрокаталитического СУР3А4-зависимого образования 6 β -гидроксикортизола от концентрации субстрата (кортизола) в электрохимической системе в соответствии с теорией ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен. Параметры стационарной кинетики реакции ($V_{\max}$, K_M) были рассчитаны на основе анализа полученной зависимости как 89 ± 5 нмоль 6 β -гидроксикортизола в мин на нмоль электроактивного фермента и 10 ± 2 мкМ кортизола, соответственно.

С помощью разработанного метода анализа кортизол-гидроксилазной активности СУР3А4 показано, что абиратерон ингибирует 6 β -гидроксилазную активность фермента. При концентрации кортизола 50 мкМ (значение константы Михаэлиса для данного субстрата было определено как 10 ± 2 мкМ) и концентрации абиратерона от 1 нМ до 50 мкМ, последний ингибирует 6 β -гидроксилазную активность СУР3А4, значение IC_{50} при данных условиях было определено как 114 ± 46 нМ (рис. 6). Для сравнения, при тех же условиях известный ингибитор СУР3А4 – кетоконазол ингибирует 6 β -гидроксилазную активность фермента со значением IC_{50} равным 70 ± 5 нМ.

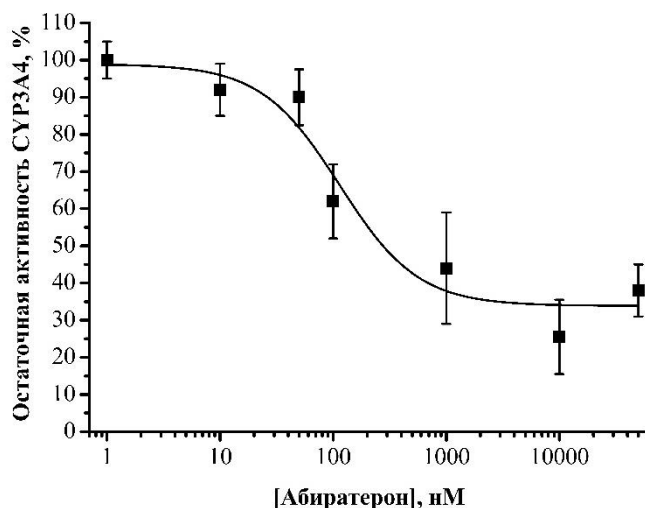


Рис. 6. Зависимость остаточной гидроксилазной активности СУР3А4 по отношению к 50 мкМ кортизолу от концентрации абиратерона в системе (от 1 нМ до 50000 нМ). Представлены средние значения $\pm$ стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Таким образом, выявлены ингибиторные свойства абиратерона по отношению к СУР3А4-зависимому метаболизму кортизола. Снижение метаболизма стероидных гормонов под действием СУР3А4 может приводить к повышению уровня прогрессии рака предстательной железы, особенно в случае наличия мутантных форм рецептора андрогенов в клетках опухоли.

6. Исследование субстрат-ингибиторных свойств галетерона по отношению к CYP3A4

Принимая во внимание, что абиратерон индуцирует спектральные изменения CYP3A4 II (ингибиторного) типа, при этом способен окисляться при участии этого фермента, предположено, что и галетерон может проявлять субстратные свойства по отношению к данному ферменту. Возможные субстратные свойства галетерона были исследованы с помощью электрохимической системы на основе иммобилизованного на электроде CYP3A4. Анализ продуктов CYP3A4-зависимой реакции по отношению к галетерону проводился методом масс-спектрометрии. Основываясь на данных спектрального анализа и молекулярного докинга, было сделано предположение, что галетерон окисляется по одному из атомов азота бензимидазольного фрагмента с образованием N-оксида галетерона. Масс-спектрометрический анализ выявил наличие пика с величиной m/z 405,2529, близкой к расчётному значению m/z для N-оксида галетерона – 405,2537 ($[C_{26}H_{33}N_2O_2 + H^+]$), и пик со значением m/z 380,2580, близким к расчётному значению m/z для галетерона – 380,2587. Отношение интенсивности пика с m/z 405,2529 к интенсивности пика с m/z 380,2580 составило $0,033 \pm 0,005$, при этом данное отношение интенсивностей пиков в контрольном эксперименте при проведении электрокаталитической реакции по отношению к галетерону в отсутствие фермента на электроде составило $0,03 \pm 0,02$. Таким образом, можно говорить о том, что в электрохимической системе происходит N-окисление галетерона как в присутствии, так и в отсутствие фермента, при этом существенного вклада фермента в N-окисление галетерона не выявлено. Данное обстоятельство может указывать либо на отсутствие субстратных свойств галетерона по отношению к CYP3A4, либо на медленное окисление галетерона при участии данного фермента.

Выводы

1. Ингибиторы цитохрома P450 17A1 – абиратерон, галетерон и соответствующие 3-кето-Δ4-метаболиты (D4A и D4G) – в диапазоне концентраций 1-15 мкМ взаимодействуют с активным центром CYP21A2, при этом абиратерон и D4A индуцируют спектральные изменения II (ингибиторного) типа, а галетерон и D4G – I (субстратного) типа, при этом последний не гидроксилируется при участии CYP21A2; D4A и галетерон ингибируют CYP21A2 (K_i $1,8 \pm 0,8$ мкМ и 12 ± 3 мкМ, соответственно), для D4G не выявлено ингибиторной активности при концентрациях до 25 мкМ;

2. Абиратерон (в диапазоне концентраций 5-140 мкМ), D4A (в диапазоне концентраций 0,25-4 мкМ), галетерон (в диапазоне концентраций 5-50 мкМ) и D4G (в диапазоне концентраций 1-15 мкМ) взаимодействуют с активным центром CYP51A1, вызывая спектральные изменения I (субстратного) типа; абиратерон и галетерон способны гидроксилироваться под действием CYP51A1;

3. Абиратерон в диапазоне концентраций 0,2-2 мкМ вызывает спектральные изменения CYP11A1 II (ингибиторного) типа, что объясняет ранее установленные ингибиторные свойства этого соединения по отношению к ферменту;

4. D4A (в диапазоне концентраций 0,1-1,5 мкМ) взаимодействует с активным центром CYP19A1, вызывая спектральные изменения II типа и ингибируя метаболизм андростендиона при концентрации 5 мкМ до эстрона с IC_{50} $7,5 \pm 1,1$ мкМ;

5. Абиратерон, D4A и галетерон (в диапазоне концентраций 1-15 мкМ) индуцируют спектральные изменения CYP3A4 II (ингибиторного) типа. Абиратерон ингибирует CYP3A4-зависимое 6β-гидроксилирование 50 мкМ кортизола с IC_{50} 114 ± 46 нМ. Для галетерона, в отличие от абиратерона, не выявлено субстратных свойств по отношению к CYP3A4.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных журналах:

1. Masamrekh R., Kuzikov A., Veselovsky A., Toropygin I., Shkel T., Strushkevich N., Gilep A., Usanov S., Archakov A., Shumyantseva V. Interaction of 17 α -hydroxylase, 17(20)-lyase (CYP17A1) inhibitors – abiraterone and galeterone – with human sterol 14 α -demethylase (CYP51A1) // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2018. – V. 186. – P. 24-33.
2. Кузиков А.В., Масамрех Р.А., Арчаков А.И., Шумянцева В.В. Методы определения функциональной активности изоферментов цитохрома P450 // Биомедицинская химия. – 2018. – Т.64. – № 2. – С. 149-168.
3. Кузиков А.В., Масамрех Р.А., Шумянцева В.В., Арчаков А.И. Новый метод количественного определения стероидных метаболитов цитохром P450-зависимых реакций с использованием флуоресцентной спектроскопии // Доклады Академии наук – 2018. – Том 483. – № 1. – С. 101-104.
4. Kuzikov A., Masamrekh R., Shkel T., Strushkevich N., Gilep A., Usanov S., Archakov A., Shumyantseva V. Assessment of electrocatalytic hydroxylase activity of cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) by means of derivatization of 6 β -hydroxycortisol by sulfuric acid for fluorimetric assay // Talanta. – 2019. – V. 196. – P. 231-236.
5. Masamrekh R.A., Filippova T.A., Haurychenka Ya.I., Shcherbakov K.A., Veselovsky A.V., Strushkevich N.V., Shkel T.V., Gilep A.A., Usanov S.A., Shumyantseva V.V., Kuzikov A.V. Estimation of the inhibiting impact of abiraterone D4A metabolite on human steroid 21-monooxygenase (CYP21A2) // Steroids. – 2020. – V. 154. – P. 108528.
6. Masamrekh R.A., Kuzikov A.V., Haurychenka Ya.I., Shcherbakov K.A., Veselovsky A.V., Filimonov D.A., Dmitriev A.V., Zavialova M.G., Gilep A.A., Shkel T.V., Strushkevich N.V., Usanov S.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. In vitro interactions of abiraterone, erythromycin, and CYP3A4: implications for drug–drug interactions // Fundamental and Clinical Pharmacology. – 2020. – V. 34(1). – P. 120-130.
7. Masamrekh R.A., Filippova T.A., Haurychenka Y.I., Sherbakov K.A., Veselovsky A.V., Shumyantseva V.V., Kuzikov A.V. The interactions of a number of steroid-metabolizing cytochromes P450 with abiraterone D4A metabolite: spectral analysis and molecular docking // Steroids. – 2020. – V.162. – P. 108693.
8. Masamrekh R.A., Filippova T.A., Sherbakov K.A., Veselovsky A.V., Shumyantseva V.V., Kuzikov A.V. Interactions of galeterone and its 3-keto- Δ 4 metabolite (D4G) with one of the key enzymes of corticosteroid biosynthesis – steroid 21-monooxygenase (CYP21A2) // Fundamental and Clinical Pharmacology. – 2020. – V. 35(2). – P. 423-431.

Материалы научных конференций:

9. Масамрех Р.А., Кузиков А.В., Арчаков А.И., Шумянцева В.В. Электрохимический анализ каталитической активности стероид-метаболизирующих изоферментов цитохрома P450. Третий съезд аналитиков России 8-13 октября 2017 г., Москва, Россия, 125.
10. Масамрех Р.А., Латышева А.С., Завьялова М.С., Кузиков А.В. Взаимодействие противоопухолевых соединений – ингибиторов CYP17A1 – со стероид-метаболизирующими изоферментами цитохрома P450. МОБИ-ХимФарма2019. Юбилейная V Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» 15-18 сентября 2019, Судак, Крым, Россия, 49.
11. Масамрех Р.А., Латышева А.С., Завьялова М.Г., Кузиков А.В. Взаимодействия соединений, обладающих противоопухолевой активностью, с потенциальными молекулярными мишенями среди стероид-метаболизирующих изоферментов цитохрома P450. II Объединенный научный форум: VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» 1-6 октября 2019, Сочи, Россия, 89.

12. Гавриченко Я.И., Филиппова Т.А., Масамрех Р.А., Кузиков А.В., Щербаков К.А. Взаимодействие метаболитов противоопухолевых препаратов абиратерона и галетерона со стероид 21-монооксигеназой (CYP21A2). 24-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века» 20-24 апреля 2020, Пущино, Россия, 165.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДДАБ – дидодецилдиметиламмония бромид
ДМСО – диметилсульфоксид
ПГЭ – печатный графитовый электрод
ЭР- α – эстрогеновый рецептор α
ЭР- β – эстрогеновый рецептор β
SNAPS – 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат
CYP – цитохром P450
CYP3A4 – цитохром P450 3A4
CYP11A1 – цитохром P450 11A1, 20,22-десмолаза, фермент, расщепляющий боковую цепь холестерина
CYP11B1 – цитохром P450 11B1, 11 β -гидроксилаза
CYP11B2 – цитохром P450 11B2, альдостеронсинтаза
CYP17A1 – цитохром P450 17A1, 17 α -гидроксилаза, 17,20-лиаза
CYP19A1 – цитохром P450 19A1, ароматаза
CYP21A2 – цитохром P450 21A2, 21-гидроксилаза
CYP51A1 – цитохром P450 51A1, ланостерин 14 α -деметилаза
D4A – 3-кето- Δ 4-метаболит абиратерона
D4G – 3-кето- Δ 4-метаболит галетерона
GPR30 – сопряжённый с G-белком рецептор эстрогенов 30 (англ. G-protein coupled receptor 30)
 h – коэффициент Хилла
 IC_{50} – концентрация ингибитора, при которой активность фермента снижается вдвое
 K_i – константа ингибирования
 K_M – константа Михаэлиса
 K_S – спектральная константа диссоциации
 $K_{S0,5}$ – спектральная константа диссоциации для кооперативного связывания
 m/z – отношение массы иона к заряду
NADPH – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат
NADP⁺ – окисленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат
 R^2 – коэффициент детерминации
SRD5A – стероид-5 α -редуктаза
SRD5B – стероид-5 β -редуктаза
SULT2A1 – гидроксистероидсульфотрансфераза
 V – скорость ферментативной реакции
 V_{max} – максимальная скорость ферментативной реакции
 ΔA – разность поглощений при максимуме и минимуме в дифференциальных спектрах
 ΔA_{max} – максимальная разность поглощений при максимуме и минимуме в дифференциальных спектрах
3 α -HSD – 3 α -гидроксистероид дегидрогеназа
3 β -HSD – 3 β -гидроксистероиддегидрогеназа