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

На правах рукописи

Масамрех Рами Ахмад

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ СО СТЕРОИД-МЕТАБОЛИЗИРУЮЩИМИ ИЗОФЕРМЕНТАМИ ЦИТОХРОМА Р450

03.01.04 – Биохимия

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор Шумянцева Виктория Васильевна

Москва – 2021

содержание

Введение	4
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ СТРАТЕГИИ ЛЕЧЕНИЯ РАКА	
ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (Обзор	
литературы)	14
1.1. Молекулярные основы патогенеза рака предстательной железы	14
1.2. Стратегии фармакотерапии рака предстательной железы	18
1.3. Цитохромы Р450 как потенциальные молекулярные мишени	
соединений для лечения рака предстательной железы	24
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	32
2.1. Реактивы	32
2.2. Оборудование	33
2.3. Методы	34
2.3.1. Химический синтез метаболита галетерона D4G	34
2.3.2. Абсорбционная спектроскопия	35
2.3.3. Исследование ингибиторной активности D4A, галетерона и D4G	
по отношению к СҮР21А2	36
2.3.4. Исследование электрокаталитической активности СҮР51А1 по	
отношению к абиратерону и галетерону	37
2.3.5. Исследование ингибиторной активности D4A и D4G по	
отношению к СҮР19А1	39
2.3.6. Исследование кортизол-гидроксилазной активности СҮРЗА4 в	
присутствии абиратерона	41
2.3.7. Определение электрокаталитической монооксигеназной	
активности СҮРЗА4 по отношению к абиратерону и галетерону	42
ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	44
3.1. Исследование взаимодействий абиратерона, D4A, галетерона и	
D4G с активными центрами ферментов методом абсорбционной	
спектроскопии	44
3.1.1. Исследование взаимодействий абиратерона, D4A, галетерона и	
D4G с активным центром СҮР21А2	46
3.1.2. Исследование взаимодействий абиратерона, D4A, галетерона и	
D4G с активным центром СҮР51А1	56
3.1.3. Исследование взаимодействий абиратерона, D4A, галетерона и	
D4G с активным центром СҮР11А1	67
3.1.4. Исследование взаимодействий абиратерона, D4A, галетерона и	
D4G с активным центром СҮР19А1	72
3.1.5. Исследование взаимодействий абиратерона, D4A, галетерона и	
D4G с активным центром СҮРЗА4	75
3.2. Исследование субстрат-ингибиторных свойств D4A, галетерона и	
D4G по отношению к СҮР21А2	88
3.3. Исследование субстратных свойств абиратерона и галетерона по	
отношению к СҮР51А1	91

3.4. Исследование ингибиторной активности D4A и D4G по	
отношению к СҮР19А1	99
3.5. Исследование кортизол-гидроксилазной активности СҮРЗА4 в	
присутствии абиратерона	103
3.6. Определение электрокаталитической монооксигеназной	
активности СҮРЗА4 по отношению к абиратерону	110
3.7. Исследование субстрат-ингибиторных свойств галетерона по	
отношению к СҮРЗА4	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
ВЫВОДЫ	117
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	119
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	121
БЛАГОДАРНОСТИ	138

введение

Актуальность темы и степень её разработанности

Рак предстательной наиболее железы является одним ИЗ распространённых заболеваний среди мужчин старше 40 лет, проживающих в развитых странах. Современной стратегией фармакотерапии кастрационнорезистивного рака предстательной железы является, с одной стороны, снижение уровня андрогенов за счёт использования ингибиторов 17αгидроксилазы, 17,20-лиазы (цитохрома Р450 17А1, СҮР17А1) – ключевого фермента биосинтеза андрогенов, а с другой – блокирование взаимодействия андрогенов с рецепторами андрогенов опухолевых клеток за счёт применения антагонистов рецептора [1, 2]. CYP17A1 катализирует реакцию 17агидроксилирования 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 [3].

Препарат абиратерон (17-(3-пиридил)андроста-5,16-диен-3β-ол), являющийся эффективным ингибитором СҮР17А1 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 17α-гидроксилазной активности СҮР17А1, что приводит к снижению биосинтеза глюкокортикоидов и возрастанию уровня минералокортикоидов [4]. В связи с этим продолжается поиск более эффективных и селективных ингибиторов СҮР17А1, 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

3βорганизме действием установлено, что В под гидроксистероиддегидрогеназы $(3\beta$ -HSD) абиратерон подвергается окислению по гидроксильной группе в третьем положении стероидного более фрагмента образованием активного 3-кето-Д4-производного с абиратерона (D4A) [2, 5]. 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 [2]. 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-(4циано-3-(трифлуорометил)фенил)-5,5-диметил-4-оксо-2-тиоксоимидазолидин-1-ил)-2-флуоро-*N*-метилбензамид) [2]. Также D4A продемонстрировал большую, по сравнению с абиратероном, противоопухолевую активность на ксенографтах у мышей [2]. 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 Axyca (Auchus) химическим синтезом были получены и охарактеризованы производные абиратерона, отличающиеся структурой кольца А стероидного фрагмента, в том числе и D4A [6]. Методом дифференциальной абсорбционной спектроскопии авторы показали, что D4A более эффективно связывается с СҮР17А1, по сравнению с абиратероном (значения констант диссоциации комплексов были определены как 0,1 нМ и 2,6 нМ, соответственно). Однако эффективность ингибирования СҮР17А1 метаболитом абиратерона D4A и абиратероном практически не отличалась (значения констант ингибирования по отношению к 17α-гидроксилазной активности СҮР17А1 были определены как 22 нМ и 27 нМ, соответственно). Кроме того, оба ингибитора демонстрировали смешанный тип ингибирования

СҮР17А1. 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 $(5\alpha$ -абиратерон и 5 β -абиратерон), которые в дальнейшем могут подвергаться восстановлению под действием 3α-гидроксистероид дегидрогеназы (3α-HSD) и 3β-HSD [5]. 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 у пациентов способно аккумулировать в организме D4A, потенциируя тем самым фармакологический эффект абиратерона [5, 7]. Кроме того, было высказано предположение, что дальнейшая разработка ингибиторов SRD5B, вызывающей инактивацию D4A, позволит в большей степени увеличить фармакологический потенциал 3-кето- $\Delta 4$ -производного 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-3βол, ТОК-001, VN/124) рассматривается в качестве противоопухолевого препарата для лечения рака предстательной железы [8]. Галетерон более эффективно и селективно ингибирует 17,20-лиазную активность СҮР17А1,

чем абиратерон (IC₅₀ 300 нМ и 800 нМ для галетерона и абиратерона, соответственно) [9, 10]. Галетерон обладает большим сродством к рецептору андрогенов в клетках линии рака предстательной железы LNCaP, по сравнению с абиратероном [9]. Действие галетерона в большей степени связано с антагонизмом рецептора андрогенов. Также, как и для абиратерона, было установлено, что галетерон подвергается действию 3β -HSD c образованием соответствующего фармакологически активного 3-кето-Д4производного галетерона (D4G), который в дальнейшем подвергается действию SRD5A, SRD5B, 3 β -HSD и 3 α -HSD [8]. Взаимодействие галетерона метаболитов, взаимодействие как И D4A И его co стероидметаболизирующими изоформами цитохрома Р450 практически не изучено.

Поскольку ингибиторы СҮР17А1 и их метаболиты, являющиеся перспективными противоопухолевыми агентами для лечения рака предстательной железы, имеют стероидную структуру, велика вероятность их взаимодействия с цитохромами Р450, 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 взаимодействует со стероид 21-гидроксилазой (СҮР21А2), напрямую катализирующей 21-гидроксилазную реакцию по отношению к прогестерону 17α-гидроксилированному производному образованием И его с кортикостероидов дезоксикортикостерона 11-дезоксикортизола, — И соответственно [11]. Было сделано заключение, что абиратерон вызывает комплексные изменения в метаболизме стероидов вследствие ингибирования как 17α-гидроксилазной активности СУР17А1, так и СУР21А2, приводящие к значительному снижению биосинтеза глюкокортикоидов. Абиратерон также ингибирует стероид 11β-гидроксилазу (СҮР11В1) и альдостеронсинтазу (СҮР11В2), что приводит к изменению продукции кортикостероидных гормонов [12, 13].

В качестве потенциальной фармакологической мишени для лечения опухолей гормон-зависимых рассматривается цитохром P450 51A1 (CYP51A1), катализирующий реакцию 14а-деметилирования ланостерина с образованием 14-десметилланостерина (4,4-диметилхолеста-8(9),14,24-триен-3β-ола), являющегося предшественником биосинтеза холестерина И, гормонов [14]. Ингибирование следовательно, стероидных синтеза холестерина может приводить не только к снижению продукции стероидных гормонов, активирующих пролиферацию клеток опухолей, но и к нарушению формирования клеточных мембран [15].

Известно, что существенную роль в развитии рака предстательной железы играют эстрогены [16, 17]. Ключевым ферментом биосинтеза эстрогенов, катализирующим реакцию ароматизации кольца Α андростендиона и тестостерона, приводящую к образованию эстрадиола и эстрона, соответственно, является цитохром Р450 19А1 (ароматаза, СУР19А1). В норме клетки предстательной железы экспрессируют ядерные рецепторы эстрогенов ЭР-а и ЭР-β, а также сопряжённый с G-белком рецептор 30 (GPR30) [17]. Кроме того, клетки предстательной железы человека экспрессируют ароматазу [18], обеспечивающую собственный биосинтез эстрогенов. Принято считать, что активация **ЭP-**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 [17]. 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 СҮР19А1 [19, 20], при этом влияние их 3-кето- $\Delta 4$ -метаболитов на этот фермент не изучено.

Кроме перечисленных выше метаболических превращений, абиратерон подвергается метаболизму при участии цитохрома Р450 ЗА4 (СҮРЗА4) и

гидроксистероидсульфотрансферазы (SULT2A1) с образованием фармакологически неактивной формы абиратерона – N-оксид сульфата абиратерона [2]. По сравнению с абиратероном, взаимодействие его фармакологически активного метаболита D4A, а также галетерона и D4G с ферментами метаболизма ксенобиотиков, такими как СҮРЗА4, остаётся СҮРЗА4-зависимый изученным. метаболизм практически не 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. СҮРЗА4, 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, [21], следовательно, разрабатываемые кортизол) 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-Δ4метаболитов (D4A и D4G)) с активными центрами стероидметаболизирующих ферментов суперсемейства цитохрома P450 (СҮР21A2, СҮР51A1, СҮР11A1, СҮР19A1, СҮР3A4) с помощью абсорбционной спектроскопии;

2) определить равновесные параметры взаимодействия лигандов с активными центрами стероид-метаболизирующих ферментов суперсемейства цитохрома Р450;

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 расчеты и статистическую обработку полученных Молекулярный экспериментальных докинг данных. проводился при лаборатории непосредственном участии сотрудников структурной биоинформатики ИБМХ (заведующий лабораторией д.б.н. Веселовский Александр Владимирович и м.н.с. Щербаков Кирилл Андреевич), массспектрометрический анализ проводился при непосредственном участии м.н.с. ИБМХ лаборатории системной биологии 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

абсорбционной Впервые методами спектроскопии исследовано взаимодействие противоопухолевых соединений (абиратерона, галетерона и их 3-кето- Δ 4-метаболитов – D4A и D4G, соответственно), являющихся фармакологическими агентами для лечения рака предстательной железы, с активными центрами стероид-метаболизирующих изоферментов цитохрома P450 (СҮР21А2, СҮР51А1, СҮР11А1, СҮР19А1, СҮРЗА4). На основании проведённого анализа выявлены молекулярные мишени новых соединений получены противоопухолевых И равновесные значения спектральных констант диссоциации соответствующих комплексов (K_S). Методами молекулярного докинга охарактеризованы комплексы исследуемых противоопухолевых соединений с активными центрами СҮР21А2, СҮР51А1, СУР11А1, СУР19А1, СУРЗА4. Впервые была исследована ингибиторная активность D4A, галетерона и D4G по отношению к одному из ключевых ферментов биосинтеза кортикостероидных гормонов – СУР21А2. Впервые выявлены субстратные свойства абиратерона и галетерона по отношению к СҮР51А1 с помощью электрохимической системы на основе СҮР51А1. 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 стероидметаболизирующих цитохромов P450 молекулярных мишеней абиратерона, D4A, галетерона, D4G и установление механизмов взаимодействия для выявленных пар.

работы Практической значимостью является возможность спрогнозировать побочные эффекты вследствие взаимодействий новых противоопухолевых соединений для лечения рака предстательной железы со P450. стероид-метаболизирующими Выявленные цитохромами взаимодействия метаболизма спрогнозировать позволяют изменения

стероидных гормонов: изменение активности СҮР21А2 может усилить основной побочный эффект ингибиторов СҮР17А1; СҮР51А1 – приводить как к снижению биосинтеза стероидов, так и к нарушению образования мембран опухолевых клеток; СҮР19А1 – приводить к нарушению биосинтеза эстрогенов, что может неоднозначно влиять на прогрессию рака CYP3A4 предстательной железы; вызывать межлекарственные взаимодействия, что стоит учитывать при совместном приёме препаратов, метаболизируемых этим ферментом.

Положения, выносимые на защиту

Абиратерон, галетерон и соответствующие 3-кето-∆4-метаболиты (D4A и D4G)) взаимодействуют с активным центром СҮР21А2, при этом абиратерон и D4A индуцируют спектральные изменения II типа, а галетерон и D4G – I типа;

2. D4A и галетерон ингибируют СҮР21А2;

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 СҮР19А1, 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.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ СТРАТЕГИИ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (Обзор литературы)

1.1. Молекулярные основы патогенеза рака предстательной железы

Предстательная железа человека содержит псевдоисчерченный эпителий с тремя типами клеток: люминальные, базальные и нейроэндокринные [22, 23]. Клетки рака предстательной железы носят фенотипы люминальных или базальных клеток эпителия [24-31]. Клиническое значение типа клеток, из которых формируется рак предстательной железы, остаётся не до конца определённым: в одном из исследований авторы заключают, что опухоли, образованные из люминальных клеток, являются более агрессивными, и фенотип люминального эпителия является отягчающим прогностическим признаком, по сравнению с фенотипом базального эпителия [25], тогда как в другом исследовании обнаружена связь между происхождением клеток рака предстательной железы из стволовых клеток базального эпителия и более агрессивным подтипом рака [32]. Малигнизация клеток предстательной железы проходит в несколько этапов: простатическая интраэпителиальная неоплазия, локализованный рак предстательной железы, прогрессирующая аденокарцинома предстательной с локальной инвазией, железы метастатический рак предстательной железы [33]. На сегодняшний день для прогностической оценки рака предстательной железы наиболее широко используется шкала Глисона, в основе которой лежит оценка гистологических характеристик опухоли [34].

Основной особенностью рака предстательной железы является восприимчивость к активации андрогенового сигналинга через рецептор андрогенов, что впервые отметили в 1941 году Хаггинс и Ходжес, сообщив, что кастрация приводила к снижению прогрессии опухоли у пациентов с раком предстательной железы [35]. Однако в ряде случаев кастрация не

приводит к снижению прогрессии рака предстательной железы, в связи с чем такие опухоли называют кастрационно-резистентными. Одной из причин развития кастрационно-резистентного рака предстательной железы может являться продукция андрогенов из холестерина и других предшественников самой опухоли [36-38]. Другим механизмом клетками поддержания прогрессии опухоли после кастрации может являться повышенная чувствительность рецептора андрогенов к стероидным гормонам. Ген рецептора андрогенов расположен на длинном плече Х-хромосомы. Первый экзон кодирует N-концевой домен рецептора, способный самостоятельно активировать транскрипцию андроген-зависимых генов, и включает в себя повторы кодонов САС, кодирующих остаток глутамина. Большинство мужчин имеют от 19 до 25 повторяющихся кодонов САС в первом экзоне гена рецептора андрогенов [39]. Короткие повторы ассоциированы с повышенной активацией транскрипции [40] и повышенным риском развития рака предстательной железы [41]. Второй и третий экзоны кодируют ДНКсвязывающий домен, содержащий структурный мотив по типу «цинковый палец», способный связываться с участками ДНК, восприимчивыми к андрогеновому сигналингу. Четвёртый экзон кодирует шарнирный домен. Пятый и шестой экзоны кодируют лиганд-связывающий домен, способный связываться с тестостероном и дигидротестостероном. В неактивном состоянии андрогеновый рецептор связан с белком теплового шока Hsp90, поддерживающим конформацию рецептора, выгодную для связывания с лигандами. При связывании рецептора с андрогеном в цитоплазме Hsp90 диссоциирует, и две молекулы рецептора андрогенов, связанные с лигандами, фосфорилируются, проникают в ядрышко и претерпевают конформационные приводящие образованию гомодимера. Образующийся изменения, К гомодимер связывается с соответствующими участками ДНК И коактиваторными и регуляторными белками, среди которых коактиваторы стероидного рецептора 1, 2 и 3 (SRC1, SRC2, SRC3), семейство коактиваторов р300-СВР. Рецептор андрогенов регулирует экспрессию генов, продукты

которых выполняют различные функции: секретируемые белки (сериновая протеаза каликреин-3, также известная как простат-специфический антиген), стимуляторы роста (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 и предшественник β-амилоида APP), модулятор активности фосфоинозитол-3-киназы FKBP5, факторы транскрипции (NKX3.1 и FOXP1), ферменты метаболизма (киназа кальций-кальмодулин зависимой протеинкиназы 2), регуляторы клеточного цикла (убиквитин-конъюгированный фермент E2 C и белок, содержащий трансформирующую кислую биспираль 2) и другие [42].

Исследования, использовавшие классические подходы и секвенирование нового поколения, позволили выявить, что большинство типов рака предстательной железы имеют мутации в генах, ответственных за сигнальные пути андрогенов, таких как ген рецептора андрогенов *AR*, гены коактиваторов рецептора андрогенов NCOA1 и NCOA2, гены репрессоров рецептора андрогенов NCOR1 и NCOR2 [43-46], что может приводить к резистентности к кастрации. Кроме того, в трети случаев метастатического кастрационнорезистивного рака предстательной железы встречаются перестройки гена AR, проявляющиеся в экспрессии изменённых вариантов рецептора андрогенов с отсутствующим лиганд-связывающим доменом, что приводит к постоянной активации рецептор-зависимого сигналинга (как в случае сплайс-варианта 7 рецептора андрогенов (AR-V7)) и, по-видимому, стимулирует рост опухоли, а также обеспечивает резистентность лекарственным К препаратам, направленным на подавление синтеза андрогенов, и/или антагонистам рецепторов андрогенов [47, 48]. Имеются сведения о вариантах мутаций рецептора андрогенов, приводящих к активации рецептора кортизолом и кортизоном, что приводит к потере восприимчивости опухоли на лечение противоандрогенными препаратами [49]. Также имеются данные о том, что встречаются повторяющиеся мутации в гене FOXA1, кодирующем фактор, подавляющий андрогеновый сигналинг и стимулирующий рост опухоли [50-52].

Помимо андрогенов, на развитие рака предстательной железы влияют и эстрогены [53, 54]. Более того, предполагается, что только совместное действие андрогенов и эстрогенов способно вызвать малигнизацию клеток предстательной железы [55]. В норме клетки предстательной железы экспрессируют три типа рецепторов эстрогенов – эстрогеновый рецептор-а $(ЭР-\alpha)$, эстрогеновый рецептор- β (ЭР- β) и сопряжённый с G-белком рецептор 30 (GPR30) [56, 57]. Клетки рака предстательной железы также способны экспрессировать все три типа рецепторов эстрогенов. Имеются сведения о том, что уровень экспрессии ЭР-α выше в случае более агрессивных типов рака предстательной железы (4 и 5 по шкале Глисона) [58]. Для ЭР-β, напротив, показана потеря экспрессии в клетках рака предстательной железы, имеющих 4 и 5 уровни по шкале Глисона, однако экспрессия ЭР-β может наблюдаться в клетках метастазов [59]. Было показано, что экспрессия ЭР-а негативно сказывается на прогнозе течения заболевания [60], тогда как активация ЭР-β антипролиферативный эффект [61, 62]. Одним из имеет факторов, приводящим к такому противоположному действию рецепторов эстрогенов, является их различное влияние на циклин D1, провоцирующий пролиферацию клеток: ЭР-α стимулирует транскрипцию гена этого белка, а ЭР-β не только напрямую подавляет транскрипцию циклина D1, но и ингибирует ЭР-αзависимое стимулирование транскрипции [63, 64]. Кроме того, ЭР-α подавляет транскрипцию генов, активируемых онкосупрессором TP53, а ЭР-β вновь активирует транскрипцию этих генов [65]. По имеющимся данным, вклад в метастазирование рака предстательной железы вносят мутации в гене TP53 [66, 67], что характерно и для патогенеза многих других опухолей.

Отмечено, что при метастатическом раке предстательной железы мутации в генах онкосупрессоров представляют собой единичные события, тогда как мутации в генах, ответственных за андрогеновый сигналинг, как правило, затрагивают несколько участков генома и могут быть независимыми в разных метастазах [68]. В совокупности эти исследования демонстрируют, что для повышения эффективности терапии рака предстательной железы требуются мультифокальные и продолжительные анализы как первичных опухолей, так и метастазов.

1.2. Стратегии фармакотерапии рака предстательной железы

Лечение рака предстательной железы зависит от стадии и тяжести заболевания, а также от возраста пациента и включает хирургическое вмешательство, химиотерапию, радиотерапию и/или терапию, направленную сигналинга [69]. Последняя на подавление андрогенового зачастую комбинации радиотерапией используется В с ИЛИ хирургическим вмешательством в случае лечения локализованного рака предстательной железы при рецидиве болезни, определяемом по повышению уровня простатспецифического антигена. В случае метастазирования прибегают к направленной на подавление андрогенового терапии, сигналинга, В комбинации с химиотерапией. Терапия, направленная на подавление андрогенового сигналинга, включает два подхода: хирургическая кастрация (орхиэктомия) или чаще применяемая химическая кастрация с помощью лекарственных препаратов, таких как агонисты гонадотропин-релизинг гормона, антагонисты рецептора андрогенов и ингибиторы цитохрома Р450 17A1 (CYP17A1) фермента биосинтеза ____ ключевого андрогенов (дегидроэпиандростерона и андростендиона) из прогестогенов (прегненолона прогестерона). CYP17A1 17α-гидроксилирование И катализирует прегненолона образующиеся 17α-И прогестерона, при ЭТОМ гидроксилированные производные могут подвергаться СҮР17А1-зависимой лиазной реакции с выделением уксусной кислоты и соответствующих андрогенов (рис. 1).



Рис. 1. Реакции, катализируемые СҮР17А1.

До 2010 года золотым стандартом лечения кастрационно-резистивного рака предстательной железы являлась химиотерапия с помощью доцетаксела, неспецифического противоопухолевого препарата, блокирующего клеточное деление в фазах G₂ и М клеточного цикла [70, 71]. Современной стратегией лечения рака предстательной железы является использование антиандрогенов, таких как абиратерон (17-(3-пиридил)андроста-5,16-диен-3β-ол), ингибитор ключевого фермента биосинтеза андрогенов СУР17А1 [72]. Абиратерон обладает относительно низкой биодоступностью, поэтому в клинической практике применяется ацетат абиратерона (остаток уксусной кислоты находится в третьем положении стероидного фрагмента) под коммерческим названием ZYTIGA[®], который быстро всасывается и деацетилируется в организме пациентов с образованием абиратерона [73]. Абиратерон ингибирует как 17α-гидроксилазную, так и 17,20-лиазную активности СҮР17А1, что приводит к снижению продукции как андрогенов, так и кортикостероидных гормонов, поскольку 17α-гидроксилированные производные субстратов СУР17А1 (17а-гидроксипрегненолон и 17агидроксипрогестерон) являются предшественниками обеих указанных групп стероидных гормонов [74]. В клинических испытаниях абиратерон, по сравнению с плацебо, увеличивал продолжительность жизни пациентов как

получавших ранее химиотерапию для лечения рака предстательной железы, так и не получавших таковую, однако наблюдались побочные эффекты, связанные с повышением уровня минералокортикоидов: отёки, гипокалиемия и гипертензия [75-78]. Эти побочные эффекты удалось сократить благодаря назначению пациентам для совместного приёма с абиратероном препаратов группы глюкортикостероиды преднизона или преднизолона в дозах 5 мг дважды в сутки [75, 76]. Кроме того, взаимодействия абиратерона с другими ферментами, в том числе семейства цитохромов Р450, обуславливают возникновение побочных эффектов других И межлекарственных взаимодействий на уровне метаболизма лекарственных соединений. Так, показано, что абиратерон ингибирует СҮРЗА4-зависимое гидроксилирование D₃ [79], обладающего 1α,25-дигидроксивитамина противоопухолевой активностью за счёт рецетор-опосредованной регуляции экспрессии циклинов A1, D1, D3, E1, циклинзависимых киназ и их ингибиторов, анти- и проапоптотических белков, а также белков, участвующих в процессе ангиогенеза (фактор роста эндотелия сосудов, тромбоспондина-1 И интерлейкина 8) [80]. Имеются свидетельства ингибирования абиратероном 11β-гидроксилазы (цитохром Р450 11В1; СҮР11В1), на что указывает значительное повышение уровня продукта каталитической активности этого фермента 11-дезоксикортизола при приёме ацетата абиратерона [81]. Также выявлено взаимодействие абиратерона со стероид 21-монооксигеназой (цитохром P450 21A2; CYP21A2), приводящее к снижению активности фермента ПО отношению к 17α-гидроксипрогестерону, что может обуславливать усиление тяжести основного побочного эффекта абиратерона, связанного со снижением продукции кортикостероидных гормонов [11]. Кроме того, использование ацетата абиратерона с преднизоном приводит к снижению метаболизма противокашлевого средства декстрометорфана ((+)-3метокси-17-метил-(9α,13α,14α)-морфинана), что указывает на ингибирование СҮР2D6. Абиратерон может вступать в межлекарственные взаимодействия, возникающие вследствие изменений метаболизма таких лекарственных

соединений как анальгетики (гидрокодон, кодеин), антидепрессанты (венлафаксин), бета-адреноблокаторы (метопролол), антидиабетические (пиоглитазон), статины (аторвастатин), препараты катализируемого различными изоферментами цитохрома P450 (СУР1А2, СУР2С8, СУР2D6, CYP2C9, CYP2C19) [82].

Ha метаболизма сегодняшний день известно несколько путей абиратерона, при этом метаболиты могут обладать фармакологической активностью и вступать в межлекарственные взаимодействия. Абиратерон способен подвергаться окислению под действием СҮРЗА4, при этом как образующийся N-оксид абиратерона, так и сам абиратерон могут подвергаться сульфонированию под действием гидроксистероидсульфотрансферазы (SULT2A1) с образованием соответствующих производных (рис. 2) [83, 84].



Рис. 2. Схема метаболизма абиратерона при участии СҮРЗА4 и SULT2A1.

Ацетат абиратерона, абиратерон, сульфат абиратерона и N-оксид сульфата абиратерона способны ингибировать СҮР2С8-зависимые Nдеэтилирование антибиотика для лечения малярии амодиахина (4-[(7хлорохинолин-4-ил)амино]-2-(диэтиламинометил)фенола) И (5-(4-[2-(5-этилпиридин-2гидроксилирование пиоглитазона ил)этокси]бензил)тиазолидин-2,4-диона) [85]. Абиратерон также подвергается окислению под действием 3β-гидроксистероиддегидрогеназы (3β-HSD) в организмах пациентов с образованием 3-кето- Δ 4-абиратерона (D4A), обладающего более высокой, чем абиратерон, противоопухолевой активностью за счёт ингибирования 3 β -HSD и стероид-5 α -редуктазы (SRD5A), а также высокого сродства к рецептору андрогенов (IC₅₀ = 7,9 нМ) [2]. Поскольку D4A способен метаболизироваться под действием SRD5A с образованием агониста рецептора андрогенов и стероид-5β-редуктазы с образованием неактивных производных (рис. 3), рассматривается стратегия повышения терапевтической эффективности использования абиратерона для лечения рака предстательной железы за счёт накопления в организме пациентов D4A путём применения соединений, препятствующих дальнейшему метаболизму D4A, таких как ингибитор SRD5A дутастерид (17β-*N*-[2,5-бис(трифлуорометил)фенил]карбамоил-4-аза-5α-андрост-1-ен-3-он) [5].



Рис. 3. Схема метаболизма абиратерона при участии 3α-HSD, 3β-HSD, SRD5A и SRD5B.

Кроме того, разрабатываются новые производные стероидов для лечения предстательной железы, среди которых одним ИЗ наиболее рака перспективных является 3β-гидрокси-17-(1*H*-бензимидазол-1-ил)андроста-5,16-диен (галетерон), разработанный в Университете Мэриленда [9]. Показано, что галетерон более эффективно, чем абиратерон, ингибирует активность CYP17A1, а также способен ингибировать SRD5A и связываться с рецептором андрогенов, в том числе с AR-V7, инактивируя его [9, 86-89]. Кроме того, установлено, что галетерон способен вызывать протеосомальную деградацию рецептора андрогенов через активацию соответствующей убиквитинлигазы [90, 91]. Отмечено, что применение галетерона не приводит к развитию выраженных побочных эффектов, связанных с изменением метаболизма кортикостероидных гормонов [10]. Аналогично абиратерону,

галетерон способен подвергаться окислению под действием 3 β -HSD, SRD5A, SRD5B и 3 α -HSD, приводящему к образованию фармакологически активного 3-кето- Δ 4-метаболита галетерона (D4G) и дальнейшему его преобразованию в соответствующие метаболиты (рис. 4) [8]. В отличие от абиратерона и его метаболитов, галетерон и его метаболиты схожи по своей фармакологической активности [8].



Рис. 4. Схема метаболизма галетерона при участии 3α-HSD, 3β-HSD, SRD5A и SRD5B.

1.3. Цитохромы Р450 как потенциальные молекулярные мишени соединений для лечения рака предстательной железы

К суперсемейству цитохромов Р450 относятся гем-тиолатные монооксигеназы, катализирующие широкий спектр реакций по отношению к ксенобиотикам, в том числе лекарственным препаратам, и эндогенным

соединениям, среди которых стероидные гормоны, жирные кислоты, эйкозаноиды, витамины [21]. Как было отмечено выше, СҮР17А1 является одной из главных молекулярных мишеней соединений для лечения рака абиратерон, предстательной железы, таких как галетерон И ИХ фармакологически активные 3-кето- Δ 4-метаболиты. Поскольку данные соединения являются производными стероидов, велика вероятность их взаимодействия с другими стероид-метаболизирующими ферментами, в том числе относящихся к суперсемейству цитохрома Р450. Такого рода взаимодействия могут приводить как к ингибированию ферментов, так и к метаболизму лекарственных соединений с изменением их фармакологической активности. В свою очередь, ингибирование стероид-метаболизирующих повышать эффективность фармакотерапии ферментов может рака предстательной железы или вызывать негативные побочные эффекты, связанные с изменением уровня стероидных гормонов в организме пациента.

Цитохром P450 51A1 (CYP51A1) катализирует трёхстадийное 14адеметелирование ланостерина через образование 30-гидроксиланостерина, 30-оксоланостерина, последующим окисляемого до С отщеплением муравьиной кислоты и образованием 4,4-диметилхолеста-8(9),14,24-триен-3βола в пути биосинтеза холестерина (рис. 5). Холестерин играет важную роль в развитии рака предстательной железы, поскольку необходим для организации мембран клеток и является предшественником стероидных гормонов [92]. Кроме того, имеются сведения о том, что холестерин способствует эпителиально-мезенхимальному переходу клеток рака предстательной железы [93]. В связи с этим, препараты из группы статинов рассматриваются как лекарственные соединения для снижения развития рака возможные предстательной железы [92, 94]. Таким образом, СҮР51А1 рассматривается как потенциальная мишень противоопухолевых соединений, при этом высказывается предположение о снижении проявления побочных эффектов, по сравнению с применением статинов, поскольку ингибирование биосинтеза холестерина на более поздних стадиях может позволить не затрагивать другие

метаболические пути, задействующие предшественники холестерина, такие как синтез убихинона, долихолов и пренилированных белков [15].



Рис. 5. Реакции, катализируемые СҮР51А1.

Первую лимитирующую стадию синтеза стероидных гормонов – образование прегенолона из холестерина – катализирует цитохром Р450 11А1 (20,22-десмолаза; фермент, расщепляющий боковую цепь холестерина; CYP11A1) В три стадии: гидроксилирование по 20 положению, 22 гидроксилирование по положению и отщепление изокапронового альдегида (рис. 6) [95]. Поскольку прегненолон является предшественником стероидных гормонов, ингибирование СУР11А1 может приводить К

снижению синтеза андрогенов и других стероидных гормонов, влияющих на рак предстательной железы, и, в связи с этим, рассматривается как один из возможных способов повышения эффективности фармакотерапии рака предстательной железы [96], В том числе при индивидуальной непереносимости абиратерона, также способного ингибировать данный фермент [97]. Одним препаратов, ингибирующих CYP11A1 ИЗ И применяющихся лечения предстательной ДЛЯ рака железы при индивидуальной переносимости абиратерона, является препарат группы противоопухолевых гормональных аминоглутетимид (3-(4средств аминофенил)-3-этил-2,6-пиперидиндион), среди побочных эффектов которого выделяют дисфункцию надпочечников, гипотироидизм, нарушения работы печени и щитовидной железы [97].



Рис. 6. Реакции, катализируемые СҮР11А1.

Цитохром Р450 21А2 (стероид 21-монооксигеназа; СУР21А2) – фермент, 21-гидроксилирование 17αкатализирующий прогестерона И гидроксипрогестерона образованием кортикостероидов 11с дезоксикортикостерона и 11-дезоксикортизола, соответственно (рис. 7) [98]. Изменения активности этого фермента могут приводить к нарушениям метаболизма кортикостероидных гормонов, что может усиливать один из основных побочных эффектов абиратерона, а именно снижение синтеза глюкокортикоидных гормонов.



Рис. 7. Реакции, катализируемые СҮР21А2.

Цитохром Р450 11В1 (11β-гидроксилаза; СҮР11В1) катализирует 11βгидросксилирование 11-дезоксикортикостерона и 11-дезоксикортизола с образованием кортикостерона и кортизола, соответственно (рис. 8) [13]. Как отмечалось выше, последний и его метаболит – кортизон – могут активировать мутантную форму рецептора андрогенов, что приводит к прогрессии рака предстательной железы в обход андрогенов. Данное обстоятельство является аргументом для рассмотрения CYP11B1 как одной из молекулярных мишеней лекарственных соединений для лечения рака предстательной железы, однако высказываются опасения, связанные со снижением уровня кортизола и соответствующим повышением минералокортикоидных гормонов, что может приводить к соответствующим побочным эффектам такой терапии, поэтому рекомендуется перед её назначением выяснять, является ли рецептор андрогенов мутантным у конкретного пациента [13].



Рис. 8. Реакции, катализируемые СҮР11В1.

Цитохром Р450 19А1 (ароматаза; СҮР19А1) – фермент, катализирующий сопряжённое с ароматизацией 19-деметилирование андрогенов андростендиона и тестостерона – с образованием соответствующих эстрогенов – эстрона и эстрадиола, соответственно (рис. 9) [13]. Реакции, катализируемые СҮР19А1, протекают в три этапа: гидроксилирование по 19 положению андрогенов, дальнейшее окисление до 19-оксопроизводных и фрагмента в отщепление окисленного виде муравьиной кислоты с образованием ароматического кольца. Как отмечено выше, эстрогены играют неоднозначную роль в развитии рака предстательной железы, поэтому исследование взаимодействия соединений для лечения этого заболевания с CYP19A1 представляет интерес. Стоит отметить, что предложенная ранее стратегия лечения рака предстательной железы, основанная на использовании селективных ингибиторов ароматазы, таких как анастрозол и летрозол, оказалась неэффективной [99, 100]. Тем не менее, препараты для лечения рака предстательной железы, основной мишенью которых является CYP17A1, могут взаимодействовать с другими стероид-метаболизирующими ферментами, усиливая или снижая таким образом эффективность проводимой фармакотерапии.



Рис. 9. Реакции, катализируемые СҮР19А1.

Цитохром P450 3A4 (СҮРЗА4) – фермент I фазы метаболизма огромного числа ксенобиотиков, включая более 50% лекарственных препаратов [21], среди которых противоопухолевые препараты для лечения онокологических заболеваний, включая рак предстательной железы, такие как абиратерон, энзалутамид [101], циклофосфамид (*N*,*N*-бис(2-хлорэтил)-2-оксо-1,3,2⁵оксазафосфинан-2-амин) [102]. Взаимодействия P450 с цитохромом лекарственных соединений могут обуславливать изменение ИХ фармакологической активности, включая инактивацию, a также взаимодействия межлекарственные за перекрёстного счёт изменения метаболизма на уровне этого фермента. Кроме того, СҮРЗА4 катализирует реакции по отношению к эндогенным соединениям, включая стероидные гормоны [21]. Ингибирование этих реакций может влиять на терапевтический эффект проводимой фармакотерапии, как в случае ингибирования абиратероном СҮРЗА4-зависимого гидроксилирования витамина D₃ [79].

Заключение

Таким образом, на сегодняшний день разрабатываются различные подходы для фармакотерапии рака предстательной железы, в том числе направленные на регуляцию активности стероид-метаболизирующих изоферментов цитохрома Р450. В случае применения производных стероидного ряда, таких как абиратерон, галетерон и их метаболиты, велика неспецифического взаимодействия вероятность ИХ co стероидметаболизирующими изоферментами цитохрома Р450, не являющимися их прямыми молекулярными мишенями. Такого рода взаимодействия могут приводить как к изменению ожидаемой фармакологической активности разрабатываемых лекарственных препаратов, так и появлению побочных эффектов, влияющих на развитие рака предстательной железы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Реактивы

Абиратерон (чистота \geq 99%) получен от ChemLeader, Ltd., Китай; галетерон (чистота $\geq 98\%$), кортизол (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 ≥ 99,7%), изопропоксид алюминия (чистота ≥ 98%), кетоконазол (чистота ≥ 99%), метаболит абиратерона D4A (чистота \geq 98%), метанол (чистота \geq 99,9%), муравьиная кислота (чистота \geq 99%), прогестерон (чистота \geq 99%), серная кислота (чистота ≥95%), толуол (безводный, чистота 99,8%), трифторуксусная кислота (чистота ≥ 99%), хлороформ (чистота ≥ 99,5%), циклогексанон (чистота 99,8%), этанол (чистота \geq 96%), этилацетат (чистота \geq 99,8%), KH₂PO₄ (чистота \geq 99%), K₂HPO₄ (чистота \geq 98%), NaCl (чистота \geq 99,5%), 1,2дидодеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (чистота \geq 99%, синтетический), 21гидроксипрогестерон (чистота ≥ 97%), 2,5-дигидробензойная кислота (чистота \geq 99%), 6β-гидроксикортизол (чистота \geq 98%) были получены от Sigma-Aldrich, США; хлорид метилена (чистота \geq 99%, стабилизированный 0,08%) этанолом) был получен от ECOS-1, Россия; MgCl₂ · $6H_2O$ (чистота 99%) был получен от Acros organics, CША; NADPH (чистота $\geq 97\%$) был получен от Sorachim, Швейцария; ацетонитрил (чистота \geq 99,8%) были получены от Fisher Scientific, Англия.

Препараты ферментов (СҮР21А2, СҮР51А1, СҮР11А1, СҮР19А1, СҮР3А4 человека, а также NADPH-зависимая цитохром Р450 редуктаза крысы) получены в Институте биоорганической химии НАН Беларуси, как описано ранее [103-106].

2.2. Оборудование

Спектрофотометрические измерения проводились с помощью спектрофотометра CARY 100 Scan UV-Vis (Agilent Technologies, Inc., CША) 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 массспектрометра 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 Daltonicks, Германия).

Электрохимические измерения проводились с использованием потенциостата/гальваностата PGSTAT 12 Autolab или µAutolab Type III (Metrohm Autolab BV, Нидерланды) с программным обеспечением GPES (версия 4.9.7). В работе использовались трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО «КолорЭлектроникс», Россия); с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения. 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 пластиковой ячейке объёмом 1 мл.

Bce электрохимические измерения проводились комнатной при температуре (22) \pm 3°C). Bce электрохимические потенциалы R 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).

2.3. Методы

2.3.1. Химический синтез метаболита галетерона D4G

Химический синтез метаболита галетерона D4G был выполнен путём окисления гидроксильной группы в третьем положении галетерона по методу Оппенауэра. Галетерон (25 мг, 0,064 ммоль) был добавлен в раствор изопропоксида алюминия (20 мг, 0,1 нмоль) 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 положительном режиме В В диапазоне масс, соответствующем теоретически рассчитанному значению m/z для D4G, 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°С, 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

Daltonicks, Германия). Значение m/z для D4G ([C₂₆H₃₀N₂O + H⁺]) было рассчитано как 387,2431 и найдено – 387,2435.

2.3.2. Абсорбционная спектроскопия

Исследования по взаимодействию абиратерона, D4A, галетерона и D4G с изоферментами цитохрома Р450 (СҮР21А2, СҮР51А1, СҮР11А1, СҮР19А1, СҮРЗА4) проводились методом абсорбционной спектроскопии. 150 мкМ СҮР21А2 (в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 0,2% СНАРЅ, 0,3 M NaCl, 3 мМ β-меркаптоэтанола и 20% глицерина по объёму), 121 мкМ СҮР51А1 (в 300 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,2, содержащем 0,2% CHAPS, 1 мМ дитиотреитола и 20% глицерина по объёму), 45 мкМ СҮР19А1 (в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,3 M NaCl, 0,2% СНАРЅ и 20% глицерина по объёму), 118 мкМ СҮР11А1 (в 50 мМ калийфосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,3 M NaCl, 0,2% CHAPS и 20% глицерина по объёму) и 131 мкМ СҮРЗА4 (в 550 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,2, содержащем 0,2% CHAPS, 1 мМ дитиотреитола 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 (рН 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 Р450 были рассчитаны, используя программное обеспечение OriginPro 7.5 или 8.1, путём нелинейной регрессии зависимости P450, разности поглощения цитохромов полученных С помощью

дифференциальной абсорбционной спектроскопии, в максимуме и минимуме от концентрации соответствующего лиганда в инкубационной смеси.

2.3.3. Исследование ингибиторной активности D4A, галетерона и D4G по отношению к CYP21A2

Ингибиторная активность D4A по отношению к СУР21А2 исследовалась с помощью реконструированной ферментативной системы: 115 мкл 50 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 20% глицерина по объёму и 13 1,2-дидодеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина, мМ подвергали ультразвуковой дезинтеграции в ультразвуковой бане Elmasonic S10H (Elma, Германия) в течение 5 мин при температуре 35°С, затем добавляли 10 мкл 15 мМ MgCl₂, 1 мкл 150 мкМ рекомбинатного цитохрома СУР21А2 человека, 1 мкл 165,9 мкМ рекомбинантной NADPH-зависимой цитохром P450 редуктазы 10 75 мМ глюкозо-6-фосфата, 1 мкл мкл глюкозо-6крысы, 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°С 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 мин при 13400 rpm (12100 × 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°С под потоком аргона. Упаренные образцы растворяли в 20 мкл этанола и наносили на алюминиевые пластины с нанесённым на тонкослойной поверхность хроматографии силикагелем для с
флуоресцентным агентом (TLC Silica gel 60 F254, Merck, Германия). Также в качестве контроля на пластину наносили 1 мкл прогестерона (10 мМ), 21гидроксипрогестерона (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 HM (Vilber Lourmat, Франция). Пятна, соответствующие 21гидроксипрогестерону, изолировали и элюировали с помощью 600 мкл этанола. Частицы силикагеля осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 13400 rpm (12100 × 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 СҮР21А2 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.

2.3.4. Исследование электрокаталитической активности СҮР51А1 по отношению к абиратерону и галетерону

Активность СҮР51А1 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 работе В использовали электроды с графитовыми рабочим (диаметр 2 мм) и вспомогательным электродами и хлоридсеребряным электродом сравнения трафаретной (000)(Ag/AgCl),полученные методом печати «КолорЭлектроникс»). На поверхность рабочего графитового электрода наносили 1 мкл 100 мМ ДДАБ в хлороформе. После испарения хлороформа (10

мин) наносили 1 мкл СҮР51А1, разведённого до 20,2 мкМ 100 мМ калийфосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 50 мМ NaCl. Электроды оставляли на 12 часов во влажной камере при 4°С. Серию СҮР51А1-зависимых электрокаталитических реакций проводили с помощью потенциостата µAUTOLAB III (Metrohm Autolab, Нидерланды) с программным обеспечением GPES 4.9.7. Исследование электрокаталитической активности СУР51А1 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 СҮР51А1 инкубационная смесь содержала 1 мкМ кетоконазола. Амперометрический отклик **CYP51A1** на добавку этанола вычитали ИЗ изменения восстановительного тока фермента при титровании растворами абиратерона или галетерона в этаноле. Кинетические параметры СҮР51А1 по отношению к абиратерону были получены путём нелинейной регрессии с помощью программного обеспечения OriginPro 7.5.

С целью анализа продуктов СҮР51А1-зависимых электрокаталитических реакций по отношению к абиратерону и галетерону электрокаталитические реакции проводили с помощью электрохимической системы на основе СҮР51А1 при фиксированном потенциале рабочего электрода -600 мВ (отн. Ag/AgCl) в течение 30 мин в 1 мл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% этанола и 50 мкМ абиратерон или 50 мкМ галетерона. Электрокаталитические реакции проводили при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. В качестве контроля электрокаталитические реакции 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% 10 трифторуксусной мг/мл. кислоты, ДО концентрации 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 мин. 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.

2.3.5. Исследование ингибиторной активности D4A и D4G по отношению к СҮР19А1

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 (рН 7,4), содержащего 20% глицерина и 13 мМ 1,2-дидодеканоил-sn-глицеро-3фосфохолина, были обработаны с помощью ультразвуковой бани Elmasonic S10H (Elma, Германия) в течение 5 мин при температуре 35°С. После обработки в полученный раствор были добавлены 10 мкл 15 мМ MgCl₂, 1 мкл 86 мкМ человека, рекомбинатного 2,2 77 цитохрома CYP19A1 МКЛ 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°С и постоянном перемешивании (700 rpm) с помощью термошейкера TS-100C (Biosan, Латвия) в течение 30 мин. Для остановки реакции и экстракции стероидных продуктов 300 мкл хлороформа вносились в инкубационную смесь с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 12100 × g с помощью микроцентрифуги Minispin (Eppendorf, Германия). Процедура экстракции повторялась дважды. После центрифугирования нижняя органическая фаза отбиралась и упаривалась при температуре 58°С под потоком аргона. Упаренные образцы растворялись в 20 мкл этанола и наносились на алюминиевые пластины для тонкослойной хроматографии с флуоресцентным реагентом, покрытые силикагелем (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 объему), 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 мин. 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 мин при 12100 × g. Концентрацию эстрона в надосадочной жидкости определяли спектрофотометрически в кварцевых микрокюветах объемом 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 (рН 7,4), содержащий 20% глицерина, далее экстрагировался и хроматографировался из упаренных образцов аналогично вышеописанной методике. Активность СУР19А1

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.

2.3.6. Исследование кортизол-гидроксилазной активности СҮРЗА4 в присутствии абиратерона

Определение каталитической активности СУРЗА4 по отношению к глюкокортикоидному гормону – кортизолу – проводилось с помощью флуоресцентного анализа производного продукта реакции, образующегося в ходе СҮРЗА4-зависимой электрокаталитической реакции. Ферментные электроды были приготовлены по аналогичной методике, описанной выше для СҮР51А1, при этом на модифицированный рабочий электрод наносился 1 мкл 131 мкМ СҮРЗА4. Серию СҮРЗА4-зависимых электрокаталитических реакций проводили с помощью потенциостата µAUTOLAB III (Metrohm Autolab, GPES Нидерланды) программным обеспечением 4.9.7. с Время электрокаталитической реакции от 5 до 60 мин, 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 кортизола. В качестве контроля проводились электрокаталитические реакции с использованием электрода, модифицированного ДДАБ, без фермента в присутствии 100 мкМ кортизола в течение 60 мин. После проведения СҮРЗА4-зависимой электрокаталитической реакции реакционная смесь смешивалась с двойным объёмом раствора серной кислоты и этанола (3:1) и инкубировалась 10 мин 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 объемом 350 мкл. Для исследования влияния абиратерона на кортизолактивность CYP3A4 гидроксилазную электрокаталитическая реакция

проводилась при тех же условиях, но в присутствии различных концентраций абиратерона или кетоконазола (от $1 \cdot 10^{-9}$ до $5 \cdot 10^{-5}$ M) в электрохимической системе, при этом ферментный электрод предварительно инкубировался в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержавшем 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 $5 \cdot 10^{-5}$ M). Активность СҮРЗА4 выражалась в нмоль образовавшегося в процессе электрокаталитической реакции 6 β -гидроксикортизола за 1 минуту 1 нмоль фермента.

2.3.7. Определение электрокаталитической монооксигеназной активности СҮРЗА4 по отношению к абиратерону и галетерону

Ферментные электроды, приготовленные как описано выше, помещались в электрохимическую ячейку объёмом 300 мкл, заполненную 100 мМ калийфосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 50 мМ NaCl, 0,5% метанола по объёму, 0,5% этанола по объёму и 50 мкМ абиратерон или 50 мкМ галетерон. Электрокаталитические реакции проводились в течение 20 минут при фиксированном значении потенциала рабочего электрода -600 мВ (отн. Ag/AgCl) и температуре 22 ± 3 °C в условиях постоянного перемешивания с помощью магнитной мешалки. После проведения реакции в инкубационную добавлялся двойной объём хлороформа, смесь полученная смесь центрифугировалась в течение 10 мин при 13400 rpm (12100 × g) с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия). После центрифугирования нижняя фаза отбиралась в виалу, и растворитель упаривался при 58°С под потоком аргона. Экстракция проводилась дважды для каждого из образцов. Упаренные ацетонитрил:вода 1:1 образцы растворялись В смеси по объёму И анализировались методом масс-спектрометрии. Масс-спектры регистрировались в положительном режиме с помощью FTICR MS ApexUltra (Bruker, Германия) в диапазоне масс, соответствующем теоретически рассчитанным значениям *m/z* для продуктов электрокаталитической СҮРЗА4-

реакции по отношению к абиратерону или галетерону. Образцы вводились в источник электроспрейной ионизации при потоке 1,5 мкл/мин с потоком распыляющего газа 2,5 л/мин. Температура входного капилляра – 200°С, 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 мин для предотвращения переноса образцов. Масс-спектры визуализировались с помощью программного обеспечения DataAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics, Германия).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. 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 Р450 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 характеристическим изменениям в дифференциальных спектрах цитохрома Р450 с максимумом поглощения при длине волны около 390 нм и минимумом поглощения при длине волны около 420 нм [107]. 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 Р450 и изменениям в дифференциальных спектрах с характеристическим максимумом поглощения при длине волны около 425-440 нм и минимумом – около 415 нм или меньше [107]. 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 ($K_{\rm S}$) и максимальную разность поглощений при максимуме и минимуме в дифференциальных спектрах ($\Delta A_{\rm max}$) по уравнениям (1) или (2) [6]:

$$\Delta A = \Delta A_{\max}(2[E])^{-1} \left[K_{S} + [E] + [L] - \{ (K_{S} + [E] + [L])^{2} - 4[E][L]) \}^{\frac{1}{2}} \right] (1)$$

$$\Delta A = \frac{\Delta A_{\max}[L]}{K_{S} + [L]} \tag{2}$$

где ΔA – разность поглощений при максимуме и минимуме в дифференциальных спектрах; ΔA_{max} – максимальная разность поглощений при максимуме и минимуме в дифференциальных спектрах; [E] – концентрация фермента, M; K_{S} – спектральная константа диссоциации, M; [L] – концентрация лиганда, M.

Уравнение (1) как правило используется, если значение *K*_S значительно меньше концентрации фермента, что указывает на высокое сродство лиганда к белку, уравнение (2) – при значениях *K*_S сопоставимых или превышающих концентрацию фермента.

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 (3) [108]:

$$\Delta A = \frac{\Delta A_{\max}[L]^h}{K_{\text{S}0,5}^h + [L]^h} \tag{3}$$

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 ($\Delta A_{max}/K_s$) [109].

Таким образом, для выявления возможных взаимодействий новых потенциальных противоопухолевых соединений с активными центрами цитохромов P450, катализирующих ключевые стадии стероидогенеза, был использован метод абсорбционной спектроскопии.

3.1.1. Исследование взаимодействий абиратерона, D4A, галетерона и D4G с активным центром CYP21A2

Ранее было показано, что абиратерон способен связываться с активным центром CYP21A2 и ингибировать 21-гидроксилазную активность фермента по отношению к 17α-гидроксипрогестерону [11]. Ингибиторные свойства по отношению к данному ферменту ожидались и от D4A, галетерона и D4G, поскольку данные соединения имеют стероидную структуру, при этом D4A и D4G имеют кетогруппу в 3 положении стероидных фрагментов молекул, аналогичную природным субстратам этого CYP21A2.

Исследовано взаимодействие D4A с активным центром CYP21A2 методом абсорбционной спектроскопии. Показано, что при насыщающей концентрации D4A (10 мкМ) наблюдается батохромный сдвиг абсолютного спектра CYP21A2, характеризующийся сдвигом полосы Соре с 419 нм до 422 нм, α-полосы – с 570 нм до 576 нм и β-полосы – с 534 нм до 537 нм (рис. 10).



Рис. 10. Абсолютные спектры поглощения 5 мкМ СҮР21А2 (—) и 5 мкМ СҮР21А2 в присутствии насыщающей концентрации D4A (10 мкМ) (– – –) в диапазоне длин волн 350-700 нм. Регистрация абсолютного спектра проводилась в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,4), содержавшим 20% глицерина. Концентрация растворителя (метанола) не превышала 3% по объёму.

Дифференциальный абсорбционный спектр СҮР21А2 при титровании метаболитом абиратерона D4A характеризуется появлением максимума поглощения при 432 нм, минимума – при 413 нм и положением изобестической точки при 424 нм (рис. 11А). Зависимость спектральных изменений СҮР21А2 от концентрации D4A имеет гиперболический характер ($R^2 = 0.983$) (рис. 11Б). Значения ΔA_{max} и K_s , рассчитанные методом нелинейной регрессии полученной зависимости, составили 0.25 ± 0.01 и 3.4 ± 0.5 мкМ, соответственно.



Рис. 11. А Дифференциальный спектр поглощения СҮР21А2 при титровании метаболитом абиратерона D4A. Регистрация дифференциальных спектров поглощения проводилась в диапазоне длин волн 350-500 нм в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Различные концентрации метаболита абиратерона D4A (от 1 до 10 мкМ) вносились в опытную кювету, при этом соответствующий объём растворителя (метанол) вносился в контрольную кювету. Концентрация метанола в обеих кюветах не превышала 3% по объёму. Б Зависимость разности оптической плотности в дифференциальном спектре поглощения СҮР21А2 между максимумом при 432 нм и минимумом при 413 нм от концентрации D4A. Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Таким образом, по зарегистрированным спектральным изменениям СҮР21А2, индуцированным D4A, можно сказать, что последний является лигандом II типа. Кроме того, поскольку такие спектральные изменения цитохромов P450 свидетельствуют об образовании координационных связей между донорными атомами лигандов и ионом железа гема фермента, можно утверждать, что атом азота пиридинового радикала D4A участвует в образовании такой связи.

Для подтверждения предположения о возможном связывании D4A с активным центром CYP21A2, а также установления вероятного положения лиганда в активном центре фермента был проведён молекулярный докинг (рис. 12).



Рис. 12. Положение D4A (голубой цвет) в активном центре CYP21A2, полученное по результатам молекулярного докинга. Связи показаны жёлтыми пунктирными линиями. Фиолетовым цветом показан гем CYP21A2. Использована структура CYP21A2 из базы данных PDB (ID 4Y8W).

Как и в случае предсказанного ранее с помощью молекулярного докинга положения абиратерона в активном центре СҮР21А2 [11], D4A формирует гидрофобные контакты с боковыми цепями аминокислотных остатков фермента Val101, Trp202, Val287, Thr296, Val360, Leu364, однако вместо

формирования предсказанных для абиратерона гидрофобных контактов с Leu199, D4A формирует таковые с Val198. Кроме того, с помощью D4A способен молекулярного докинга показано, что формировать координационную связь между атомом азота пиридинового радикала и ионом железа гема, а также водородную связь между функциональной группой в 3 положении стероидного фрагмента и остатком Arg234 фермента длиной в 2,54 Å. Суперпозиция положений абиратерона и D4A в активном центре CYP21A2 (рис. 13), полученных методом молекулярного докинга, позволяет предположить схожее расположение лигандов в активном центре фермента.



Рис. 13. Суперпозиция положений D4A (зелёный цвет) и абиратерона (голубой цвет) в активном центре CYP21A2. Связи показаны жёлтыми пунктирными линиями. Фиолетовым цветом показан гем CYP21A2. Использована структура CYP21A2 из базы данных PDB (ID 4Y8W).

Таким образом, на основании результатов абсорбционной спектроскопии и молекулярного докинга можно предположить схожее влияние абиратерона, исследованное ранее [11], и D4A на СҮР21А2.

Методом абсорбционной спектроскопии было показано, что галетерон, в отличие от абиратерона и D4A, является лигандом I типа, вызывающим гипсохромный сдвиг абсолютного спектра поглощения СҮР21А2. При насыщающей концентрации галетерона (15 мкМ) абсолютный спектр поглощения СҮР21А2 характеризуется сдвигом полосы Соре с 419 нм до 417 нм, α-полосы – с 571 нм до 569 нм и β-полосы – с 535 нм до 533 нм (рис. 14).



Рис. 14. Абсолютный спектр поглощения 5 мкМ СҮР21А2 (—) и 5 мкМ СҮР21А2 в присутствии насыщающей концентрации галетерона (15 мкМ) (– –) в диапазоне длин волн 350-700 нм. Регистрация абсолютного спектра проводилась в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Концентрация растворителя (метанола) не превышала 3% по объёму.

Дифференциальный спектр поглощения СҮР21А2, полученный при титровании галетероном, характеризуется появлением максимума поглощения при 402 нм, минимума – при 427 нм и положением изобестической точки в области 414 нм (рис. 15А). Зависимость спектральных изменений СҮР21А2 от концентрации галетерона имеет гиперболический характер ($R^2 = 0.939$) (рис. 15Б).



Рис. 15. А Дифференциальный спектр поглощения СҮР21А2 при Регистрация дифференциальных титровании галетероном. спектров поглощения проводилась в диапазоне длин волн 350-500 нм в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Различные концентрации галетерона (от 1 до 15 мкМ) вносились в опытную кювету, при объём соответствующий растворителя (метанол) ЭТОМ вносился В контрольную кювету. Концентрация метанола в обеих кюветах не превышала 3% объёму. Б Зависимость разности оптической плотности по дифференциальном спектре поглощения СҮР21А2 между максимумом при 402 нм и минимумом при 427 нм от концентрации галетерона. Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов. Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Значения ΔA_{max} и K_{S} комплекса СҮР21А2-галетерон были рассчитаны методом нелинейной регрессии как 0,102 ± 0,006 и 3,1 ± 0,7 мкМ, соответственно.

На основании спектральных изменений СҮР21А2, индуцированных галетероном, можно сказать, что последний является лигандом I (субстратного) типа, в отличие от абиратерона и его метаболита D4A, являющихся лигандами II (ингибиторного) типа по отношению к СҮР21А2.

Аналогично галетерону D4G вызывал гипсохромный сдвиг абсолютного спектра CYP21A2, свидетельствующий о замещении молекулы воды лигандом в координационной сфере иона железа гема фермента, при этом полоса Соре CYP21A2 смещалась с 419 нм до 417 нм при насыщающей концентрации D4G (рис. 16).



Рис. 16. Абсолютный спектр поглощения 5 мкМ СҮР21А2 (—) и 5 мкМ СҮР21А2 в присутствии насыщающей концентрации D4G (15 мкМ) (– –) в диапазоне длин волн 350-700 нм. Регистрация абсолютного спектра проводилась в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Концентрация растворителя (метанола) не превышала 3% по объёму.

Дифференциальные абсорбционные спектры СҮР21А2 при титровании D4G имели максимум поглощения при 409 нм, минимум – в области 427 нм; изобестическая точка – при 420 нм (рис. 17А). Зависимость спектральных изменений СҮР21А2 от концентрации D4G имеет гиперболический характер ($R^2 = 0.985$) (рис. 17Б).



Рис. 17. А Дифференциальный спектр поглощения СҮР21А2 при титровании D4G. Регистрация дифференциальных спектров поглощения проводилась в диапазоне длин волн 350-500 нм в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,4), содержавшим 20% глицерина. Различные концентрации D4G (от 1 до 15 мкМ) вносились в опытную кювету, при этом соответствующий объём растворителя (метанол) вносился в контрольную кювету. Концентрация метанола в обеих кюветах не превышала 3% по объёму. Б Зависимость разности оптической плотности в дифференциальном спектре поглощения СҮР21А2 между максимумом при 402 нм и минимумом при 427 нм от концентрации D4G. Представлены средние значения \pm стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Основываясь на анализе зависимостей разности поглощения CYP21A2 при максимуме и минимуме (ΔA) от концентрации D4G, с помощью метода нелинейной регрессии были получены значения ΔA_{max} и K_{S} соответствующего фермент-лигандного комплекса. Значения этих параметров составили 0,059 ± 0,002 и 4,6 ± 0,4 мкМ, соответственно.

Эффективности связывания D4A, галетерона и D4G рассчитаны на основании данных, полученных с помощью методов абсорбционной спектроскопии, как $0,075 \pm 0,015$ мкM⁻¹, $0,035 \pm 0,010$ мкM⁻¹ и $0,013 \pm 0,002$ мкM⁻¹, соответственно, что указывает на более эффективное взаимодействие D4A, по сравнению с галетероном и D4G.

Для сравнения взаимодействий галетерона и D4G с CYP21A2 был проведён молекулярный докинг лигандов в активный центр фермента (PDB ID

4Y8W). Предсказанные положения лигандов относительно гема CYP21A2 были схожими: бензимидазольные фрагменты как галетерона, так и D4G были обращены в сторону гема, ближайшим к иону железа атомом был углерод в 6' Стероидные положении радикалов лигандов. фрагменты лигандов образовывали гидрофобные контакты с аминокислотными остатками Val101, Val198 Leu199, Trp202, Val287, Thr296, Val360, Leu364 активного центра СҮР21А2; кроме того, D4G образовывал гидрофобные контакты с аминокислотным остатком Ile291. Функциональные группы в 3 положении стероидных фрагментов галетерона и D4G образовывали водородные связи с аминокислотным остатком Arg234, длины связей были рассчитаны как 2,9 Å и 2,5 Å, соответственно. Суперпозиция галетерона и D4G в активном центре СҮР21А2 представлена на рисунке 18.



Рис. 18. Суперпозиция положений галетерона (голубой цвет) и D4G (зелёный цвет) в активном центре CYP21A2, полученная по результатам молекулярного докинга. Связи показаны жёлтыми пунктирными линиями. Фиолетовым цветом показан гем CYP21A2. Использована структура CYP21A2 из базы данных PDB (ID 4Y8W).

В кристаллической структуре СҮР21А2 с его природным субстратом прогестероном (PDB ID 4Y8W) последний располагается таким образом, что ближайшим к иону железа гема фермента атомом оказывается атом углерода в 21 положении (расстояние между атомами 4,0 Å), стероидные фрагменты формируют гидрофобные контакты с аминокислотными остатками Val101, Val198, Leu199, Trp202, Ile291, Val360, 3-кетогруппа формирует водородную связь с Arg234 длиной 2,7 Å. Суперпозиции положений прогестерона и галетерона (рис. 19) или D4G (рис. 20) в активном центре фермента позволяют предположить схожие расположения лигандов относительно природного субстрата, что соответствует принадлежности галетерона и D4G к лигандам I спектрального типа СҮР21А2.



Рис. 19. Суперпозиция положений галетерона (голубой цвет), полученного по результатам молекулярного докинга, и прогестерона (розовый цвет), взятого из кристаллической структуры, в активном центре CYP21A2. Связи показаны жёлтыми пунктирными линиями. Фиолетовым цветом показан гем CYP21A2. Использована структура CYP21A2 из базы данных PDB (ID 4Y8W).



Рис. 20. Суперпозиция положений D4G (зелёный цвет), полученного по результатам молекулярного докинга, и прогестерона (розовый цвет), взятого из кристаллической структуры, в активном центре CYP21A2. Связи показаны жёлтыми пунктирными линиями. Фиолетовым цветом показан гем CYP21A2. Использована структура CYP21A2 из базы данных PDB (ID 4Y8W).

Таким образом, можно заключить, что все исследуемые соединения взаимодействуют с активным центром CYP21A2, при этом абиратерон и D4A являются лигандами II типа, тогда как галетерон и D4G – I типа; наиболее эффективное связывание было установлено между D4A и активным центром фермента.

3.1.2. Исследование взаимодействий абиратерона, D4A, галетерона и D4G с активным центром CYP51A1

Способность абиратерона, D4A, галетерона и D4G взаимодействовать с CYP51A1 также была исследована с помощью абсорбционной спектроскопии. Все исследуемые лиганды вызывали спектральные изменения фермента I типа,

что указывает на сдвиг спинового равновесия иона железа гема в сторону высокоспинового состояния.

В абсолютном спектре СҮР51А1 абиратерон при насыщающих концентрациях (130 мкМ) вызывал сдвиг полосы Соре с 417 нм к 416 нм, α-полосы – с 573 нм к 569 нм и β-полосы – с 535 нм к 531 нм (рис. 21).



Рис. 21. Абсолютный спектр поглощения 5 мкМ СҮР51А1 (—) и 5 мкМ СҮР51А1 в присутствии насыщающей концентрации абиратерона (130 мкМ) (– –) в диапазоне длин волн 350-700 нм. Регистрация абсолютного спектра проводилась в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Концентрация растворителя (этанола) не превышала 3% по объёму.

Дифференциальный спектр поглощения СҮР51А1, полученный при титровании абиратероном, характеризуется появлением максимума поглощения при 309 нм, минимума – в области 424 нм и положением изобестической точки около при 409 нм (рис. 22А). Зависимость разности поглощений при максимуме и минимуме в дифференциальных спектрах от концентрации абиратерона имеет сигмоидный характер ($R^2 = 0.993$) (рис. 22Б).



Рис. 22. А Дифференциальный спектр поглощения СҮР51А1 при абиратероном. Регистрация дифференциальных титровании спектров поглощения проводилась в диапазоне длин волн 350-500 нм в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Различные концентрации абиратерона (от 5 до 130 мкМ) вносились в опытную кювету, при этом соответствующий объём растворителя (этанол) вносился в контрольную кювету. Концентрация метанола в обеих кюветах не превышала Б Зависимость разности оптической плотности 3% по объёму. дифференциальном спектре поглощения СҮР51А1 между максимумом при 390 нм и минимумом при 424 нм от концентрации абиратерона. Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Параметры связывания абиратерона с СҮР51А1 были рассчитаны путём аппроксимации оптической зависимости разности плотности В дифференциальном спектре поглощения СҮР51А1 между максимумом при 390 нм и минимумом при 424 нм от концентрации абиратерона методом нелинейной регрессии в соответствии с уравнением (3). Концентрация лиганда, при которой ΔA равна половине значения ΔA_{max} ($K_{\text{S0,5}}$) составило 22 ± 1 мкМ, при этом значение коэффициента Хилла (h) было рассчитано как 2,4 \pm 0,2, что косвенно указывает на возможность взаимодействия двух молекул абиратерона с активным центром СҮР51А1. Не исключено, что причиной сигмоидного характера зависимости спектральных изменений от концентрации абиратерона может являться агрегация молекул фермента.

При взаимодействии с СҮР51А1 D4A вызывал гипсохромный сдвиг абсолютного спектра СҮР51А1, при этом зарегистрирован сдвиг полосы Соре с 417 нм до 415 нм, α-полосы – с 569 нм до 566 нм и β-полосы с 535 до 530 нм (рис. 23).



Рис. 23. Абсолютный спектр поглощения 5 мкМ СҮР51А1 (—) и 5 мкМ СҮР51А1 в присутствии 3,75 мкМ D4A (– –) в диапазоне длин волн 350-700 нм. Регистрация абсолютного спектра проводилась в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Концентрация растворителя (метанола) не превышала 3% по объёму.

Дифференциальный спектр поглощения СҮР51А1 при взаимодействии с D4A характеризовался появлением характеристического максимума при 407 нм и минимума – при 426 нм; положение изобестической точки регистрировалось около 417 нм, что свидетельствует о взаимодействии D4A с ферментом по субстратному типу, аналогично абиратерону (рис. 24А). Как и в случае с абиратероном, зависимость разности поглощений CYP51A1 между максимумом и минимумом от концентрации D4A (рис. 24Б) имеет сигмоидный характер ($h = 1,8 \pm 0,3$), указывающий на возможное взаимодействие с активным центром фермента двух молекул лиганда одновременно, как и в случае с абиратероном, не исключая при этом возможную агрегацию молекул фермента. Значения ΔA_{max} и $K_{\text{S0,5}}$, рассчитанные на основании спектральных изменений в дифференциальных спектрах поглощения CYP51A1 при титровании D4A, были определены как $0,062 \pm 0,004$ и $1 \pm 0,1$ мкM, соответственно ($\mathbb{R}^2 = 0,972$).



Рис. 24. А Дифференциальный спектр поглощения СҮР51А1 при титровании D4A. Регистрация дифференциальных спектров поглощения проводилась в диапазоне длин волн 350-500 нм в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,4), содержавшим 20% глицерина. Различные концентрации D4A (от 0,25 до 3,75 мкМ) вносились в опытную кювету, при этом соответствующий объём растворителя (метанол) вносился в контрольную кювету. Концентрация метанола в обеих кюветах не превышала 3% по объёму. **Б** Зависимость разности оптической плотности в дифференциальном спектре поглощения СҮР51А1 между максимумом при 407 нм и минимумом при 426 нм от концентрации D4A. Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Значение $K_{S0,5}$ комплекса СҮР51А1 с D4A было более чем в 20 раз меньше по сравнению с $K_{S0,5}$ комплекса СҮР51А1 с абиратероном, что указывает на более эффективное взаимодействие D4A с СҮР51А1.

Методом молекулярного докинга выявлены наиболее вероятные расположения молекул абиратерона и D4A в активном центре CYP51A1. Поскольку для взаимодействий абиратерона и D4A с активным центром CYP51A1 установлены сигмоидные зависимости разностей оптических плотностей в дифференциальных спектрах фермента от концентраций лигандов, методом молекулярного докинга была оценена возможность одновременного связывания двух молекул абиратерона (рис. 25А) или двух молекул D4A (рис. 25Б) с активным центром фермента.



Рис. 25. Положения молекул абиратерона (**A**) и D4A (**Б**) в активном центре CYP51A1, предсказанные с помощью молекулярного докинга. Молекулы абиратерона обозначены зелёным, D4A – голубым, гем – розовым, белок – серым. Использована структура CYP51A1 из базы данных PDB (ID 3LD6).

При связывании первых молекул абиратерона или D4A В непосредственной близости к иону железа гема были расположены метильные группы 19 положения стероидных фрагментов этих лигандов, при этом абиратерон образовывал гидрофобные контакты с аминокислотными остатками Tyr131, Leu134, Trp239, Ala311, a D4A – c Tyr131, Leu134, Tyr145, Ala311, Ile377 активного центра фермента. По данным молекулярного докинга, значения энтальпии (ΔH) комплексообразования CYP51A1 с абиратероном или с D4A были определены как -11,1 ккал/моль и -11,7 ккал/моль, соответственно. Вторые молекулы абиратерона или D4A связывались на поверхности фермента в области входа в активный центр, при этом абиратерон формировал гидрофобные контакты с аминокислотными остатками Ala74, Val101, Leu240 фермента, а D4A – с Ala74, Ile75, Met100, Val101, Leu240. Кроме того, оба лиганда формировали водородные связи за счёт своих функциональных групп 3 положения стероидного фрагмента с аминокислотным остатком Lys89 CYP51A1. ΔH комплексообразования вторых молекул абиратерона и D4A были определены как -7,2 ккал/моль и -7,5 ккал/моль, соответственно. Таким образом, результаты молекулярного докинга хорошо коррелировали с результатами спектрального анализа, объясняя сигмоидный характер зависимости спектральных изменений, регистрируемых с помощью дифференциальной спектроскопии, от концентрации как абиратерона, так и D4A.

Суммируя полученные данные о взаимодействии фармакологически активного D4A с CYP51A1, можно говорить, что данный лиганд схожим с абиратероном образом взаимодействует с данным ферментом. Сравнение полученных $K_{S0.5}$ позволяет утверждать о более эффективном, по сравнению с абиратероном, взаимодействии D4A с CYP51A1. Учитывая тот факт, что CYP51A1 катализирует ключевые реакции биосинтеза холестерина, являющегося необходимым компонентом клеточных мембран, в том числе и опухолевых клеток, можно сделать предположение о влиянии D4A на биосинтез холестерина за счет модулирования активности СҮР51А1. С другой стороны, D4A, как и абиратерон, взаимодействует с СҮР51А1 ПО субстратному типу, что обуславливает его вероятное окисление под действием данного фермента и изменение при этом фармакологической активности.

Галетерон при насыщающей концентрации (50 мкМ) также вызывал гипсохромный сдвиг абсолютного спектра СУР51А1: полосы Соре с 417 нм к 416 нм; α-полосы с 573 нм к 567 нм и β-полосы с 535 нм к 533 нм (рис. 26).



Рис. 26. Абсолютный спектр поглощения 5 мкМ СҮР51А1 (—) и 5 мкМ СҮР51А1 в присутствии 50 мкМ галетерона (——) в диапазоне длин волн 350-700 нм. Регистрация абсолютного спектра проводилась в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Концентрация растворителя (этанола) не превышала 3% по объёму.

Галетерон также вызывал изменения в дифференциальных спектрах CYP51A1 аналогично абиратерону (рис. 27A). Максимум поглощения наблюдался при длине волны 390 нм, минимум – при 424 нм; изобестическая точка при 409 нм. Зависимость разности поглощения при максимуме и минимуме в дифференциальных спектрах от концентрации галетерона имеет сигмоидный характер ($R^2 = 0.992$) (рис. 27Б).



Рис. 27. А Дифференциальный спектр поглощения СУР51А1 при Регистрация дифференциальных титровании галетероном. спектров поглощения проводилась в диапазоне длин волн 350-500 нм в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Различные концентрации галетерона (от 5 до 50 мкМ) вносились в опытную кювету, при объём (метанол) ЭТОМ соответствующий растворителя вносился В контрольную кювету. Концентрация метанола в обеих кюветах не превышала объёму. Б Зависимость разности оптической 3% ПО плотности В дифференциальном спектре поглощения СҮР51А1 между максимумом при 390 нм и минимумом при 424 нм от концентрации галетерона. Представлены средние значения \pm стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Аппроксимация зависимости по методу нелинейной регрессии в соответствии с уравнением Хилла позволила рассчитать параметры связывания галетерона с CYP51A1. Значение $K_{S0.5}$ составило 16 ± 1 мкМ, при этом значение h было рассчитано как $1,97 \pm 0,23$, что указывает на возможное связывание двух молекул галетерона с активным центром фермента или агрегацию молекул фермента.

D4G при насыщающей концентрации (15 мкМ) вызывал гипсохромный сдвиг абсолютного спектра CYP51A1: полосы Cope с 418 нм к 416 нм; α-полосы с 573 нм к 571 нм и β-полосы с 536 нм к 532 нм (рис. 28).



Рис. 28. Абсолютные спектры поглощения 5 мкМ СҮР51А1 (—) и 5 мкМ СҮР51А1 в присутствии насыщающей концентрации D4G (15 мкМ) (– – –) в диапазоне длин волн 350-700 нм. Регистрация абсолютного спектра проводилась в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Концентрация органического растворителя (метанола) не превышала 3% по объёму.

Максимум поглощения в дифференциальных спектрах СҮР51А1 при титровании D4G наблюдался при 389 нм, минимум – при 422 нм (рис. 29А), что указывает на взаимодействия D4G с активным центром СҮР51А1 по I (субстратному) типу. Зависимость разности поглощения при максимуме и минимуме в дифференциальных спектрах ($\Delta A(A_{389} - A_{422})$) от концентрации D4G имеет гиперболический характер ($\mathbb{R}^2 = 0,997$) (рис. 29Б).



Рис. 29. А Дифференциальные спектры поглощения СҮР51А1 в диапазоне длин волн 350-500 нм при титровании D4G. Регистрация дифференциальных спектров поглощения проводилась в диапазоне длин волн 350-500 нм в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Различные концентрации метаболита галетерона D4G (от 1 до 15 мкМ) вносились в опытную кювету, при этом соответствующий объём растворителя (метанол) вносился в контрольную кювету. Концентрация органического растворителя (метанола) не превышала 3% по объёму. Б Зависимость разности оптической плотности в дифференциальном спектре поглощения СҮР51А1 между максимумом при 389 нм и минимумом при 422 нм от концентрации D4G. Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Аппроксимация зависимости разности поглощения при максимуме и минимуме в дифференциальных спектрах от концентрации D4G методом нелинейной регрессии позволила рассчитать значения $K_{\rm S}$ и $\Delta A_{\rm max}$, которые составили 5,4 ± 0,3 мкМ и 0,077 ± 0,002, соответственно.

Таким образом, абиратерон, D4A, галетерон и D4G индуцируют спектральные изменения CYP51A1 I (субстратного) типа, при этом значения эффективностей связывания были рассчитаны как $0,005 \pm 0,001$ мкM⁻¹, $0,060 \pm 0,013$ мкM⁻¹, $0,057 \pm 0,010$ мкM⁻¹ и $0,014 \pm 0,001$ мкM⁻¹, соответственно, что свидетельствует о наиболее эффективном связывании D4A и галетерона с ферментом. Причина сигмоидного характера зависимостей разности поглощения при максимуме и минимуме в дифференциальных спектрах от

концентрации абиратерона, D4A или галетерона может заключаться в возможности CYP51A1 связывать по две молекулы лигандов в активном центре или агрегации CYP51A1. Однако, для некоторых бактериальных CYP51 описана возможность существования фермента в «открытой» и «закрытой» формах [15], что также может объяснять кооперативный эффект при взаимодействии с лигандами. Учитывая тот факт, что CYP51A1 катализирует ключевые реакции биосинтеза холестерина, являющегося необходимым компонентом клеточных мембран, в том числе и опухолевых клеток, можно сделать предположение о возможном влиянии абиратерона, D4A, галетерона и D4G на биосинтез холестерина за счет модулирования активности CYP51A1. С другой стороны, абиратерон, D4A, галетерон и D4G взаимодействуют с CYP51A1 по субстратному типу, что позволяет предположить их вероятное окисление под действием данного фермента и изменение при этом фармакологической активности.

3.1.3. Исследование взаимодействий абиратерона, D4A, галетерона и D4G с активным центром CYP11A1

Абиратерон вызывает батохромный сдвиг абсолютного спектра поглощения CYP11A1, свидетельствующий о сдвиге спинового равновесия иона железа гема фермента в низкоспиновое состояние. При насыщающей концентрации абиратерона полоса Соре сдвигалась с 416 нм до 420 нм, α-полоса – с 570 нм до 577 нм и β-полоса – с 531 нм до 535 нм (рис. 30).



Рис. 30. Абсолютные спектры поглощения 5 мкМ СҮР11А1 (—) и 5 мкМ СҮР11А1 в присутствии насыщающей концентрации абиратерона (2 мкМ) (– –) в диапазоне длин волн 350-700 нм. Регистрация абсолютного спектра проводилась в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Концентрация органического растворителя (этанола) не превышала 3% по объёму.

Дифференциальные спектры поглощения СҮР11А1 при титровании абиратероном характеризуются появлением максимума поглощения при 428 нм и минимумом – при 412 нм; положение изобестической точки соответствует примерно 423 нм (рис. 31А). Зависимость разности поглощений между максимумом и минимумом в дифференциальных спектрах от концентрации абиратерона имеет гиперболический характер ($\mathbb{R}^2 = 0,994$) (рис. 31Б).



Рис. 31. А Дифференциальный спектр поглощения СУР11А1 при абиратероном. Регистрация дифференциальных титровании спектров поглощения проводилась в диапазоне длин волн 350-500 нм в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Различные концентрации абиратерона (от 0,2 до 2 мкМ) вносились в опытную кювету, при этом соответствующий объём растворителя (этанол) вносился в контрольную кювету. Концентрация органического растворителя (этанола) не превышала 3% объёму. Б Зависимость разности оптической по плотности В дифференциальном спектре поглощения СУР11А1 между максимумом при 428 нм и минимумом при 412 нм от концентрации абиратерона. Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Значения ΔA_{max} и K_{S} были определены как 0,146 ± 0,005 и 0,7 ± 0,07 мкМ, соответственно. Эффективность связывания была рассчитана как 0,212 ± 0,029 мкМ⁻¹. Характер спектральных изменений СҮР11А1 с абиратероном свидетельствует об образовании координационной связи между атомом азота пиридинового радикала абиратерона и ионом железа гема фермента.

В отличие от абиратерона, галетерон, D4A и D4G не вызывали спектральных изменений CYP11A1, что указывает на отсутствие взаимодействия галетерона, D4A и D4G с активным центром фермента, на основании чего можно предположить, что этот фермент не является молекулярной мишенью галетерона, D4A и D4G, и подавление стероидогенеза

на уровне биосинтеза прегненолона не лежит в основе их фармакологического действия.

Для объяснения различий между взаимодействием абиратерона и D4A с CYP11A1 был выполнен молекулярный докинг соответствующих лигандов в активный центр фермента (рис. 32).



Рис. 32. Положения молекул абиратерона (**A**) и D4A (**Б**) в активном центре CYP11A1, предсказанные с помощью молекулярного докинга. Молекулы абиратерона обозначены зелёным, D4A – голубым, гем – розовым, белок – серым. Использована структура CYP11A1 из базы данных PDB (ID 3N9Y).

Несмотря на отсутствие спектральных изменений при взаимодействии D4A с CYP11A1, молекулярный докинг показал, что оба лиганда способны связываться с активным центром фермента. При образовании комплекса абиратерона с CYP11A1 пиридиновый радикал абиратерона располагался практически параллельно плоскости гема фермента, при этом расстояние между атомом азота пиридинового радикала и ионом железа гема было рассчитано как 2,4 Å, что достаточно для образования координационной связи

между ними. Абиратерон образует гидрофобные контакты с остатками Ile84, Leu101, Leu460 молекулы CYP11A1. Рассчитанное на основании молекулярного докинга значение ΔH комплексообразования составило -12,6 ккал/моль. D4A также образует комплекс с CYP11A1, при этом, как и у абиратерона, его пиридиновый радикал лежит практически параллельно плоскости гема СҮР11А1. Однако расстояние между атомом азота пиридинового радикала D4A и ионом железа гема больше, чем у абиратерона, и составило 3,6 Å. D4A образует гидрофобные контакты с остатками Phe82, Ile84, Leu101, Phe458, Ile461 молекулы СҮР11А1. Рассчитанное на основании молекулярного докинга значение ΔH комплексообразования составило -12,9 ккал/моль. В суперпозиции молекулы абиратерона и D4A в активном центре СҮР11А1 имеют одинаковое расположение (рис. 33).



Рис. 33. Положения молекул абиратерона (зелёный цвет) и D4A (голубой цвет) в суперпозиции, полученных при докинге. Использована структура СҮР11А1 из базы данных PDB (ID 3N9Y).

Несмотря на то, что оба лиганда, по данным молекулярного докинга, не формируют водородных связей за счёт своих функциональных групп в 3 положении стероидного фрагмента ни с одним из аминокислотных остатков CYP11A1, по-видимому, эти группы могут обуславливать различия во взаимодействии данных лигандов с ферментом.

Таким образом, методом молекулярного докинга не удалось выявить существенных различий во взаимодействии абиратерона и D4A с CYP11A1, при этом D4A, галетерон и D4G, в отличие от абиратерона, не вызывают спектральных изменений CYP11A1, что указывает на отсутствие взаимодействия между этими лигандами и данным ферментом.

3.1.4. Исследование взаимодействий абиратерона, D4A, галетерона и D4G с активным центром СҮР19А1

Абиратерон в диапазоне от 1 до 10 мкМ не изменял ни абсолютный, ни дифференциальный спектр поглощения СҮР19А1. Таким образом, можно заключить, что абиратерон не взаимодействует с активным центром ключевого изофермента биосинтеза эстрогенов – СҮР19А1.

Аналогично абиратерону, галетерон и D4G не вызывали спектральных изменений CYP19A1. Однако выявлено взаимодействие D4A с активным центром CYP19A1. Показано, что D4A вызывает батохромный сдвиг абсолютного спектра поглощения CYP19A1, при этом полоса Соре сдвигается с 417 нм до 419 нм, α-полоса – с 572 нм до 574 нм, β-полоса – с 534 нм до 537 нм (рис. 34).


Рис. 34. Абсолютный спектр поглощения 4,5 мкМ СҮР19А1 (—) и 4,5 мкМ СҮР19А1 в присутствии 15 мкМ D4А (– –) в диапазоне длин волн 350-700 нм. Регистрация абсолютного спектра проводилась в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Концентрация органического растворителя (метанола) не превышала 3% по объёму.

Дифференциальные спектры поглощения СҮР19А1 при титровании D4A характеризуются появлением максимума поглощения при длине волны 431 нм и минимума – при 413 нм, положением изобестической точки примерно при 425 нм (рис. 35А). Характер дифференциальных спектров указывает на образование координационной связи между атомом азота пиридинового радикала D4A и ионом железа гема СҮР19А1. Зависимость разности поглощений СҮР19А1 при максимуме и минимуме от концентрации D4A имеет сигмоидный характер ($R^2 = 0,992$) со значением *h* равным 2 ± 0,2, что указывает на вероятное взаимодействие с активным центром двух лигандов одновременно или агрегацию молекул фермента (рис. 35Б). Значения ΔA_{max} и $K_{\text{S0,5}}$ были определены как 0,081 ± 0,004 и 0,6 ± 0,04 мкМ, соответственно. Эффективность связывания была рассчитана как 0,142 ± 0,015 мкМ⁻¹.



Рис. 35. А Дифференциальный спектр поглощения СҮР19А1 при титровании D4A. Регистрация дифференциальных спектров поглощения проводилась в диапазоне длин волн 350-500 нм в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Различные концентрации D4A (от 0,5 до 15 мкМ) вносились в опытную кювету, при этом соответствующий объём растворителя (метанол) вносился в контрольную кювету. Концентрация органического растворителя (метанола) не превышала 3% по объёму. Б Зависимость разности оптической плотности В дифференциальном спектре поглощения СҮР19А1 между максимумом при 431 нм и минимумом при 413 нм от концентрации D4A. Представлены средние значения \pm стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Был проведён молекулярный докинг D4A в кристаллические структуры CYP19A1 в комплексе с ингибитором (PDB ID: 4GL7) и субстратом (PDB ID: 3S79). В обоих случаях не удалось обнаружить положение D4A в активном центре CYP19A1, которое бы соответствовало полученному экспериментально спектру II типа. Предположительно CYP19A1 должен претерпевать значительные конформационные изменения для расположения молекулы D4A в активном центре таким образом, чтобы его атом азота пиридинового радикала вступал в координационную связь с атомом железа гема фермента.

На основании проведённого исследования методом абсорбционной спектроскопии был сделан вывод о том, что абиратерон, галетерон и D4G не

взаимодействуют с активным центром СҮР19А1, в отличие от фармакологически активного метаболита абиратерона D4A. С высокой долей вероятности можно говорить об изменении биосинтеза эстрогенов как в опухолевой, так и здоровой ткани и возможном неоднозначном влиянии такого изменения на опухолевую прогрессию при использовании стратегии аккумулирования D4A в организме пациентов с раком предстательной железы, что даёт предпосылки для дальнейших исследований.

3.1.5. Исследование взаимодействий абиратерона, D4A, галетерона и D4G с активным центром СҮРЗА4

Известно, что абиратерон является субстратом СҮРЗА4, под действием которого данный препарат подвергается N-окислению, также известно об ингибиторных свойствах абиратерона по отношению к СҮРЗА4 [79].

Методом абсорбционной спектроскопии показано, что абиратерон при насыщающей концентрации вызывает батохромный сдвиг абсолютного спектра поглощения СҮРЗА4: полосы Соре – с 417 нм до 422 нм; α-полосы – с 567 нм до 575 нм; β-полосы – с 535 до 542 нм (рис. 36).



Рис. 36. Абсолютный спектр поглощения 5 мкМ СҮРЗА4 (—) и 5 мкМ СҮРЗА4 в присутствии насыщающей концентрации абиратерона (15 мкМ) (– –) в диапазоне длин волн 350-700 нм. Регистрация абсолютного спектра проводилась в инкубационной смеси, содержавшей 0,1 М калий-фосфатный буфер (рН 7,4), 0,05 М NaCl, в кварцевых кюветах объёмом 100 мкл. Концентрация этанола не превышала 3% по объёму.

При титровании СҮРЗА4 абиратероном методом дифференциальной абсорбционной спектроскопии зарегистрированы спектральные изменения СҮРЗА4 II (ингибиторного) типа с характерными максимумом при длине волны 425 нм и минимумом – в области 393 нм; положение изобестической точки при длине волны около 416 нм (рис. 37А). Зависимость разности поглощений между максимумом и минимумом, регистрируемой методом дифференциальной абсорбционной спектроскопии, от концентрации абиратерона имела сигмоидный характер ($R^2 = 0,992$) с коэффициентом Хилла (*h*), равным 2,3 ± 0,2, указывающим на возможное связывание двух молекул лиганда с активным центром или агрегацию молекул фермента (рис. 37Б).



Рис. 37. А Дифференциальный спектр поглощения СҮРЗА4 при абиратероном. Регистрация дифференциальных титровании спектров поглощения проводилась в диапазоне длин волн 350-500 нм в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Различные концентрации абиратерона (от 1 до 15 мкМ) вносились в опытную кювету, при этом соответствующий объём растворителя (метанол) вносился в контрольную кювету. Концентрация органического растворителя (метанола) не превышала 3% объёму. Зависимость разности оптической плотности ПО Б В дифференциальном спектре поглощения СҮРЗА4 между максимумом при 425 нм и минимумом при 393 нм от концентрации абиратерона. Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

На основании анализа данной зависимости методом нелинейной регрессии были рассчитаны значения ΔA_{max} , K_{S} и *h* комплекса СҮРЗА4 с абиратероном, которые составили 0,175 ± 0,003, 3,8 ± 0,1 мкМ и 2,3 ± 0,2 соответственно.

Как и абиратерон, его метаболит D4A при насыщающей концентрации (7,5 мкМ) вызывает батохромный сдвиг абсолютного спектра СҮРЗА4, характеризующийся смещением полосы Соре с 417 нм до 422 нм, α-полосы – с 569 в 573 нм и β-полосы – с 533 нм в 536 нм (рис. 38).



Рис. 38. Абсолютные спектры поглощения 5 мкМ СҮРЗА4 (—) и 5 мкМ СҮРЗА4 в присутствии насыщающей концентрации D4A (7,5 мкМ) (– – –) в диапазоне длин волн 350-700 нм. Регистрация абсолютного спектра проводилась в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Концентрация органического растворителя (метанола) не превышала 3% по объёму.

абсорбционная спектроскопия CYP3A4 Дифференциальная при титровании D4A характеризуется максимумом поглощения при 425 нм и минимумом при 404 нм; положение изобестической точки находится около 417 нм (рис. 39А). Зависимость разности поглощений СҮРЗА4 в максимуме и дифференциальной минимуме, регистрируемая спектроскопией, OT концентрации D4A, как и в случае с абиратероном, имеет сигмоидный характер ($\mathbb{R}^2 = 0.999$) со значением *h* равным 1,5 ± 0,05, что указывает на вероятное взаимодействие более чем одной молекулы лиганда с активным центром фермента или агрегацию молекул фермента (рис. 39Б). Значения ΔA_{max} и $K_{\text{S0,5}}$, рассчитанные на основании спектральных изменений, были определены как $0,227 \pm 0,007$ и $3,7 \pm 0,2$ мкМ, соответственно.



Рис. 39. А Дифференциальный спектр поглощения СҮРЗА4 при титровании D4A. Регистрация дифференциальных спектров поглощения проводилась в диапазоне длин волн 350-500 нм в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Различные концентрации D4A (от 0,5 до 7,5 мкМ) вносились в опытную кювету, при этом соответствующий объём растворителя (метанол) вносился в контрольную кювету. Концентрация органического растворителя (метанола) не превышала 3% по объёму. Б Зависимость разности оптической плотности В дифференциальном спектре поглощения СҮРЗА4 между максимумом при 425 нм и минимумом при 404 нм от концентрации D4A. Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Для сравнительного анализа взаимодействий абиратерона и фармакологически активного D4A с СҮРЗА4 был проведён молекулярный докинг этих лигандов в активный центр фермента. Выявлены наиболее вероятные положения молекул абиратерона и D4A в активном центре СҮРЗА4, причём как в случае абиратерона, так и D4A, в активный центр могли поместиться сразу два лиганда (рис. 40), что находится в хорошей корреляции со спектральными данными, указывающими на вероятное одновременное взаимодействие двух молекул этих соединений с активным центром фермента.



Рис. 40. Положения молекул абиратерона (**A**) и D4A (**Б**) в активном центре CYP3A4, предсказанные с помощью молекулярного докинга. Молекулы абиратерона обозначены зелёным, D4A – голубым, гем – розовым, белок – серым. Использована структура CYP3A4 из базы данных PDB (ID 2V0M).

Молекулы абиратерона или D4A, находящиеся ближе к гему фермента, имели схожее расположение в активном центре, при этом атом азота пиридиновых радикалов этих лигандов был расположен таким образом, что имелась возможность образования координационной связи с ионом железа гема, длина которой была рассчитана в обоих случаях как 2,4 Å. Кроме того, молекулярный докинг выявил схожее расположение стероидных фрагментов абиратерона и D4A в активном центре и их участие в формировании одинаковых гидрофобных контактов с аминокислотными остатками Ala305, Glu374, Leu482 белка, а также формирование водородных связей между функциональной группой в 3 положении стероидного фрагмента абиратерона и остатками Arg372, Glu374 фермента, а в случае D4A – только с остатком Arg372. Значения ΔH комплексообразования СҮРЗА4 с абиратероном или с D4A, рассчитанные на основании молекулярного докинга, составили -9,5 и -9,6 ккал/моль, соответственно. При взаимодействии второй молекулы абиратерона с активным центром СҮРЗА4 молекулярный докинг выявил возможность образования гидрофобных контактов между стероидным фрагментом лиганда и аминокислотными остатками Phe108, Ile120, Phe213, Thr224 белка, а в случае с D4A – аминокислотными остатками Asp74, Phe108, Ile120, Phe213. Оба лиганда были способны образовывать водородную связь между функциональной группой в 3 положении стероидного фрагмента и аминокислотным остатком Ser119 молекулы фермента. Значения Δ*H* комплексообразования CYP3A4 со вторыми молекулами абиратерона или D4A были рассчитаны как -11,5 и -11,4 ккал/моль, соответственно. В суперпозиции молекулы абиратерона и D4A хорошо перекрываются между собой, при этом вторые молекулы обоих лигандов также хорошо перекрываются и расположены антипараллельно первым.

Методом абсорбционной спектроскопии установлено, что галетерон вызывает батохромный сдвиг абсолютного спектра, характеризующийся смещением спектральной линии Соре с 417 нм до 421 нм, α-полосы – с 573 нм до 579 нм и β-полосы – с 535 нм до 538 нм (рис. 41).



Рис. 41. Абсолютный спектр поглощения 5 мкМ СҮРЗА4 (—) и 5 мкМ СҮРЗА4 в присутствии насыщающей концентрации галетерона (17,5 мкМ) (– –) в диапазоне длин волн 350-700 нм. Регистрация абсолютного спектра проводилась в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Концентрация органического растворителя (метанола) не превышала 3% по объёму.

Дифференциальные спектры СҮРЗА4 при взаимодействии с галетероном характеризуются появлением максимума поглощения при длине волны 430 нм и минимума – при 413 нм; изобестическая точка расположена при длине волны 422 нм (рис. 42А). Зависимость разности оптической плотности между максимумом И минимумом поглощения CYP3A4, регистрируемой абсорбционной дифференциальной спектроскопией, ОТ концентрации галетерона имеет гиперболический характер ($R^2 = 0.958$) (рис. 42Б). Значение $K_{\rm S}$ комплекса СҮРЗА4 с галетероном было рассчитано как 7,5 ± 1,7 мкМ. Таким образом, галетерон, как и абиратерон, индуцирует спектральные изменения II (ингибиторного) типа, что указывает на образование координационной связи между атомом азота бензимидазольного радикала галетерона и иона железа гема. Однако, в отличие от абиратерона и D4A, связывание галетерона с активным центром СҮРЗА4 не характеризуется сигмоидной зависимостью.



Рис. 42. А Дифференциальный спектр поглощения СҮРЗА4 при галетероном. Регистрация дифференциальных титровании спектров поглощения проводилась в диапазоне длин волн 350-500 нм в кварцевых кюветах объёмом 50 мкл. Стоковый раствор фермента был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержавшим 20% глицерина. Различные концентрации галетерона (от 1 до 15 мкМ) вносились в опытную кювету, при этом соответствующий объём растворителя (метанол) вносился в контрольную кювету. Концентрация органического растворителя (метанола) не превышала 3% по объёму. Б Зависимость разности оптической плотности В дифференциальном спектре поглощения СҮРЗА4 между максимумом при 430 нм и минимумом при 413 нм от концентрации галетерона. Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Молекулярный докинг галетерона показал, что эта молекула может располагаться в активном центре СҮРЗА4, а атом азота бензимидазольного кольца ориентирован в сторону иона железа гема (рис. 43).



Рис. 43. Молекулярный докинг галетерона (фиолетовый цвет) в активном центре СҮРЗА4. Аминокислотные остатки показаны сиреневым цветом и обозначены цифрами в соответствии с их положениями в полипептидной цепи. Оранжевым цветом показан гем СҮРЗА4. Использована структура СҮРЗА4 из базы данных PDB (ID 2V0M). Атомы азота бензимидазольного радикала галетерона отмечены синим цветом; ион железа гема показан в виде оранжевой сферы.

Расстояние между атомом азота и ионом железа гема СҮРЗА4 в комплексе с галетероном составило 4,8 Å. Таким образом, результаты докинга хорошо согласуются с результатами, полученными спектральными методами. Суперпозиция докированных молекул галетерона и абиратерона показала, что стероидные фрагменты располагаются в активном центре по-разному, однако атомы азота пиридинового и бензимидазольного фрагментов соответствующих лигандов обращены в сторону иона железа гема фермента (рис. 44).



Рис. 44. Положения молекул абиратерона (жёлтый цвет) и галетерона (розовый цвет) в суперпозиции, полученных при докинге. Использована структура СҮРЗА4 из базы данных PDB (ID 2V0M).

Поскольку известный ингибитор СҮРЗА4 противогрибковый препарат (1-[4-(4-{[(2R,4S)-2-(2,4-дихлорфенил)-2-(1Н-имидазол-1кетоконазол илметил)-1,3-диоксолан-4-ил]метокси}фенил)пиперазин-1-ил]этан-1-он) также является лигандом II типа по отношению к этому ферменту, при этом установлен кооперативный характер связывания лиганда с ферментом [110], было произведено сравнение расположений молекул кетоконазола и галетерона активном центре CYP3A4, полученных В с помощью молекулярного докинга. Суперпозиция докированных молекул галетерона с двумя молекулами кетоконазола из кристаллической структуры (PDB 2V0M) показала, что молекула галетерона располагается в месте расположения второй молекулы кетоконазола, тогда как место расположения первой молекулы кетоконазола было занято молекулой галетерона лишь частично (рис. 45). Это объясняет, что галетерон не связывается кооперативно с СҮРЗА4, в отличие от абиратерона и кетоконазола.



Рис. 45. Положения молекул галетерона (розовый цвет) и двух молекул кетоконазола (серый цвет) в суперпозиции, полученных при докинге. Использована структура СҮРЗА4 из базы данных PDB (ID 2V0M).

Суммируя полученные методами абсорбционной спектроскопии и молекулярного докинга данные по взаимодействию абиратерона, D4A и галетерона с СҮРЗА4, можно с определённой степенью вероятности говорить о схожем субстратном и ингибиторном потенциале данных соединений по отношению к СҮРЗА4. Наибольшую эффективность связывания с активным центром СҮРЗА4 демонстрировал D4A (0,061 ± 0,006 мкM⁻¹), по сравнению с абиратероном (0,046 ± 0,002 мкM⁻¹) и галетероном (0,017 ± 0,005 мкM⁻¹).

Спектральные характеристики взаимодействий СҮР21А2, СҮР51А1, СҮР11А1, СҮР19А1, СҮР3А4 с абиратероном, D4A, галетероном и D4G просуммированы в таблице 1.

СҮР + лиганд	Тип	ΔA_{\max}	Характер зависимости	Коэффициент	<i>K</i> _S , мкМ	$\Delta A_{\rm max}/K_{\rm S}$, мк ${ m M}^{-1}$
	дифференциального		ΔA от концентрации	Хилла (<i>h</i>)		
	спектра		лиганда			
СҮР21А2 + Абиратерон*	II	Нет данных	Гиперболический	-	$6,3 \pm 0,2$	Нет данных
CYP21A2 + D4A	II	$0,\!25 \pm 0,\!01$	Гиперболический	-	$3,4 \pm 0,5$	$0,075 \pm 0,015$
СҮР21А2 + Галетерон	Ι	$0,102 \pm 0,006$	Гиперболический	-	$3,1 \pm 0,7$	$0,035 \pm 0,010$
CYP21A2 + D4G	Ι	$0,059 \pm 0,002$	Гиперболический	-	$4,6 \pm 0,4$	$0,013 \pm 0,002$
СҮР51А1 + Абиратерон	Ι	$0,\!106\pm0,\!002$	Сигмоидный	$2,4 \pm 0,2$	22 ± 1	$0,005 \pm 0,001$
CYP51A1 + D4A	Ι	$0,062 \pm 0,004$	Сигмоидный	$1,8 \pm 0,3$	$1 \pm 0,1$	$0,060 \pm 0,013$
СҮР51А1 + Галетерон	Ι	$0,\!109 \pm 0,\!006$	Сигмоидный	$1,\!97\pm0,\!23$	16 ± 1	$0,\!057 \pm 0,\!010$
CYP51A1 + D4G	Ι	$0,077 \pm 0,002$	Гиперболический	-	$5,4 \pm 0,3$	$0,014 \pm 0,001$
СҮР11А1 + Абиратерон	II	$0,146 \pm 0,005$	Гиперболический	-	$0,7\pm0,07$	$0,212 \pm 0,029$
CYP11A1 + D4A	Спектральные изменения не регистрируются					
СҮР11А1 + Галетерон	Спектральные изменения не регистрируются					
CYP11A1 + D4G	Спектральные изменения не регистрируются					
СҮР19А1 + Абиратерон	Спектральные изменения не регистрируются					
CYP19A1 + D4A	II	$0,081 \pm 0,004$	Сигмоидный	$2\pm0,2$	$0,\!6 \pm 0,\!04$	$0,\!142 \pm 0,\!015$
СҮР19А1 + Галетерон	Спектральные изменения не регистрируются					
CYP19A1 + D4G	Спектральные изменения не регистрируются					
СҮРЗА4 + Абиратерон	II	$0,\!175 \pm 0,\!003$	Сигмоидный	$2,3 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,1$	$0,046 \pm 0,002$
$\overline{CYP3A4} + D4A$	II	$0,\!\overline{227}\pm0,\!\overline{007}$	Сигмоидный	$1,5 \pm 0,05$	$3,7 \pm 0,2$	$0,061 \pm 0,006$
СҮРЗА4 + Галетерон	II	$0,\!12\pm0,\!01$	Гиперболический	-	$7,5 \pm 1,7$	$0,017 \pm 0,005$
CYP3A4 + D4G	Спектральные изменения не определялись					

Таблица 1. Спектральные характеристики взаимодействий изоферментов цитохрома Р450 и лигандов

* По литературным данным [11].

Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

3.2. Исследование субстрат-ингибиторных свойств D4A, галетерона и D4G по отношению к СҮР21А2

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 прогестеронгидроксилазной 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. 46), что указывает на конкурентный или смешанный тип ингибирования [111].



Рис. 46 Зависимости обратных начальных скоростей СҮР21А2-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 ± 0,8 мкM, что схоже со значением константы ингибирования абиратерона по отношению к CYP21A2зависимому 21-гидроксилированию 17α-гидроксипрогестерона (2,26 мкМ [11]).

Проявление галетероном и D4G субстратных свойств по отношению к СҮР21А2, предположенных на основании результатов дифференциальной абсорбционной спектроскопии, было исследовано с помощью реконструированной монооксигеназной Методом системы. массспектрометрии с ионизацией распылением в электрическом поле не выявлено продуктов СҮР21А2-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 47 представлены зависимости начальных скоростей CYP21A2-зависимого 21-гидроксилирования прогестерона (*V*) от концентрации прогестерона (0-100 мкМ) при различных концентрациях галетерона (А) и D4G (Б).



Рис. 47. Зависимости начальных скоростей СҮР21А2-зависимого 21гидроксилирования прогестерона (V) от концентрации прогестерона (0-100 мкМ) в присутствии различных концентраций галетерона (**A**) или D4G (**Б**): 0 мкМ (**■**), 10 мкМ (**●**), 25 мкМ (**▲**). Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Галетерон проявлял ингибиторную активность по отношению к CYP21A2, в отличие от D4G. В отсутствии галетерона значения максимальной скорости реакции (V_{max}) и константы Михаэлиса (K_{M}) составили 2,3 ± 0,2 мин⁻¹ и 11 ± 3 мкМ, соответственно. При концентрации галетерона 10 мкМ в системе V_{max} практически не менялась (2,4 ± 0,3 мин⁻¹), тогда как значение K_{M} увеличилось до 20 ± 7 мкМ. При концентрации галетерона 25 мкМ в системе значение V_{max} составило 2,8 ± 0,3 мин⁻¹, тогда как значение K_{M} возросло до 33

 \pm 7 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 СҮР21А2. Значение константы ингибирования (K_i) галетерона по отношению к СҮР21А2 было рассчитано как 12 ± 3 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 к CYP21A2 позволяет предположить более отношению сильное ингибирование фермента абиратероном и D4A, по сравнению с галетероном, что, в свою очередь, может указывать на более высокую вероятность клинических проявлений ингибирования СҮР21А2 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.

3.3. Исследование субстратных свойств абиратерона и галетерона по отношению к СҮР51А1

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 электронтранспортной цепи в виде восстановительных коферментов и редокспартнёрных белков, а цитохром P450-зависимая электрокаталитическая

91

реакция инициируется благодаря электронам, поступающим от электрода [112-115]. 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 (рН 7,4), содержащим 50 мМ NaCl (рис. 48).



Рис. 48. Циклические вольтамперограммы CYP51A1, иммобилизованного графитовом $(\Pi\Gamma\Im),$ печатном электроде на модифицированном дидодецилдиметиламмония бромидом (ДДАБ) в насыщенном аргоном 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, при скоростях сканирования от 10 до 100 мВ с⁻¹ в диапазоне потенциалов от +100 до -600 мВ (отн. Ag/AgCl). Вставка: Амплитуды пиков увеличивались линейно в зависимости от скорости сканирования от 10 до 100 мB/с. Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

На циклических вольтамперограммах иммобилизованного на электроде фермента наблюдалось 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 ($E^{0'} = (E_c + E_a)/2$) СҮР51А1 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 [116]. Поверхностная концентрация электроактивного СҮР51А1 (Γ_0) на электроде была рассчитана путём интегрирования восстановительного пика, полученного с помощью циклической вольтамперометрии, согласно уравнению (4) [117]:

$$\Gamma_0 = \frac{Q}{nFA} \tag{4}$$

где Γ_0 – поверхностная концентрация гемопротеина на электроде, моль/см²; Qколичество электричества, Кл (рассчитано путём интегрирования циклической восстановительного пика, полученного методом количество электронов, участвующих вольтамперометрии); *n* – В электрохимическом процессе (для иона железа гема n = 1); F – константа Фарадея (96485 Кл/моль); А – площадь поверхности электрода (0,0314 см²). Таким образом, поверхностная концентрация СҮР51А1, иммобилизованного на печатном графитовом электроде с помощью ДДАБ, была рассчитана как $(1,72 \pm 0,15) \cdot 10^{-11}$ моль/см².

Константа скорости переноса электронов между иммобилизованным СҮР51А1 и печатным графитовым электродом, модифицированным ДДАБ, (k_s) была рассчитана по методу Лавирона 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) [118]:

$$\ln k_{\rm s} = \alpha \ln(1-\alpha) + (1-\alpha) \ln \alpha - \alpha (1-\alpha) \left(\frac{nF\Delta E_{\rm p}}{RT}\right)$$
(5)

где α – коэффициент переноса электронов; *R* – универсальная газовая постоянная (8,314 Дж/К моль); *T* – температура (К); *v* – скорость сканирования (мВ/с).

Коэффициент переноса электронов (α) был рассчитан как 0,6 из зависимости ($E_p - E^{0'}$) от ln(v). При скорости сканирования 100 мВ/с $\Delta E = 170$ мВ, константа скорости переноса электронов (k_s) была рассчитана как 0,37 ± 0,05 с⁻¹. Значение ΔE , рассчитанное при скорости сканирования 100 мВ/с, отражает относительно медленный перенос электронов между электродом и ионом железа гема иммобилизованного фермента.

94

Разработанная электрохимическая система была использована для оценки СҮР51А1-зависимых кинетических параметров электрокаталитических абиратерону и галетерону с помощью реакций ПО отношению К амперометрического титрования при фиксированном потенциале рабочего электрода -600 мВ (отн. Ag/AgCl). При титровании абиратероном наблюдался амперометрический отклик СҮР51А1, при этом в присутствии 1 мкМ кетоконазола как ингибитора СҮР51А1 [119] в системе наблюдались меньшие значения каталитического тока по отношению к абиратерону. Галетерон вызывал незначительные изменнения восстановительного тока СУР51А1, по сравнению с добавками соответствующего объёма этанола как контроля. Данные хроноамперометрических титрований представлены на рисунке 49.



Рис. 49. Амперометрические отклики СҮР51А1 при фиксированном потенциале рабочего электроде -600 мВ (отн. Ag/AgCl) в 1 мл 100 мМ калийфосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 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 галетерона (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 ($\mathbb{R}^2 = 0,988$). В присутствии 1 мкМ кетоконазола в системе сигмоидный характер зависимости ($\mathbb{R}^2 = 0,994$) был более выраженным (рис. 50).



Рис. 50. Зависимости каталитического тока СҮР51А1, 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 ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Параметры сигмоидных зависимостей каталитического тока CYP51A1 от концентраций абиратерона были рассчитаны с помощью метода нелинейной регрессии, в соответствии с моделью уравнения Хилла. Электрохимическая форма уравнения Хилла может быть представлена как (6):

$$I_{\text{KAT}} = \frac{I_{\text{KAT MAKC}}[S]^{h}}{(K_{0,5})^{h} + [S]^{h}}$$
(6)

где $I_{\text{кат}}$ – каталитический ток (A), $I_{\text{кат макс}}$ – максимальный каталитический ток (A), [S] – концентрация субстрата (мкМ), h – коэффициент Хилла, $K_{0,5}$ –

концентрация субстрата, при которой каталитический ток равен половине максимального (мкМ).

 $I_{\text{кат макс}}$ СҮР51А1, 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 ± 0,3. В присутствии 1 мкМ кетоконазола эти параметры составили 106 ± 6 нА, 54 ± 2 мкМ и 4,3 ± 0,4, соответственно.

Для подтверждения предполагаемых субстратных свойств абиратерона и отношению CYP51A1 были также галетерона по К 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 печатных графитовых электродов, модифицированных ДДАБ. с иммобилизованным на их поверхности СҮР51А1. Контрольные эксперименты проводились при тех же параметрах с использованием модифицированных ДДАБ печатных графитовых электродов без иммобилизованного на их поверхности фермента.

После электрокаталитических реакций инкубационные смеси были проанализированы с помощью метода масс-спектрометрии (MALDI-TOF) с целью выявления продуктов предположенного на основании данных докинга абсорбционной спектроскопии молекулярного CYP51A1-И зависимого моногидроксилирования абиратерона или галетерона. В случае использования абиратерона в качестве потенциального субстрата СҮР51А1 выявлены пики со значением m/z 350,5, соответствующие абиратерону (расчётное значение m/z 350,2 ([C₂₄H₃₂NO + H⁺])), в смесях до и после как ферментативной, так и неферментативной электрокаталитических реакций, а 366,3, также значением m/zсоответствующие пики co продукту моногидроксилирования абиратерона (расчётное значение *m/z* 366.2 $([C_{24}H_{32}NO_2 + H^+])),$ в смесях после как ферментативной, так И

97

неферментативной электрокаталитических реакций (рис. 51). Отношения интенсивностей пиков со значением m/z 366,3 к интенсивностям пиков со значением m/z 350,5 для образцов после как неферментативной, так и ферментативной электрокаталитических реакций были определены как 0,03 и 0,07, соответственно, что указывает на возможное моногидроксилирование абиратерона под действием СҮР51А1.



Рис. 51. Масс-спектры смеси, содержащей абиратерон, до электрокаталитической реакции (**A**) и продуктов электрокаталитической реакции по отношению к абиратерону под действием ПГЭ/ДДАБ (**Б**) или ПГЭ/ДДАБ/СҮР51А1 (**B**) при фиксированном значении потенциала рабочего электрода -600 мВ (отн. Ag/AgCl) в течение 30 минут.

В случае использования галетерона в качестве потенциального субстрата СҮР51А1 были обнаружены пики со значением m/z 389,2, соответствующие галетерону (расчётное значение m/z 389,3 ([C₂₆H₃₃N₂O + 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 ([C₂₆H₃₃N₂O₂ + H⁺])), были обнаружены только в образцах после

ферментативной электрокаталитической реакции (рис. 52), что указывает на вклад СҮР51А1 в окисление галетерона.



Рис. 52. Масс-спектры смеси, содержащей галетерон, до электрокаталитической реакции (А) и продуктов электрокаталитической реакции по отношению к галетерону под действием ПГЭ/ДДАБ (Б) или ПГЭ/ДДАБ/СҮР51А1 (В) при фиксированном значении потенциала рабочего электрода -600 мВ (отн. Ag/AgCl) в течение 30 минут.

Таким образом, можно заключить, что абиратерон и галетерон проявляют субстратные свойства по отношению к СҮР51А1 и способны подвергаться моногидроксилированию под действием этого изофермента цитохрома Р450, что может приводить к образованию метаболитов с изменённой фармакологической активностью при приёме этих соединений в качестве лекарственных препаратов для лечения рака предстательной железы.

3.4. Исследование ингибиторной активности D4A и D4G по отношению к СҮР19А1

Поскольку в результате спектрального исследования было обнаружено связывание D4A с активным центром СҮР19А1, 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 СУР19А1. Поскольку абсорбционная спектроскопия выявила связывание D4A с активным центром свободного от субстрата СУР19А1, был исключён бесконкурентный тип ингибирования. Предположение 0 конкурентном типе ингибирования было проверено с помощью использования значительно превышающей К_М концентрации субстратов, при которой в присутствии конкурентного ингибитора скорость ферментативной реакции меняется не значительно. В качестве субстрата СУР19А1 был использован андростендион при концентрации 5 мкМ, что более чем в сто раз превышает установленное ранее значение константы Михаэлиса [120]. При данных условиях активность СҮР19А1 по отношению к андростендиону была определена как 0.26 ± 0.08 мин⁻¹. В присутствии 1 мкМ D4A наблюдалось уменьшение активности фермента до 0.21 ± 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 *К*_м в сто раз, было исключено предположение о конкурентном типе ингибирования. На рисунке 53 представлена зависимость активности СҮР19А1 (%) по отношению к андростендиону от концентрации D4A.



Рис. 53. Зависимость активности СҮР19А1 (%) по отношению к андростендиону (5 мкМ) в присутствии различных концентраций D4A (0-50 мкМ). Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Из зависимости, представленной на рисунке 53, было определено значение концентрации D4A, при которой активность CYP19A1 по отношению к 5 мкМ андростендиону уменьшалась вдвое (IC₅₀), которое составило 7,5 ± 1,1 мкМ. Поскольку IC₅₀ значительно отличается от установленного значения K_S (0,6 ± 0,04 мкМ), было предположено, что наиболее вероятным типом ингибирования D4A по отношению к CYP19A1 смешанный. Также была исследована способность D4A является ингибировать активность СҮР19А1 по отношению к 21 мкМ тестостерону (концентрация, превышающая значение К_М в 100 раз [121]). 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 СҮР19А1 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 (рис. 54), что согласуется с данными спектрального анализа.



Рис. 54. Активность СҮР19А1 (мин⁻¹) в отсутствии исследуемых веществ и при 50 мкМ D4A или D4G. Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

более фармакологически Таким образом, активный метаболит абиратерона D4A ингибирует ключевой фермент биосинтеза эстрогенов – СҮР19А1, 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 СҮР19А1, можно предположить, что стратегия аккумулирования 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 [122, 123]. Принимая во внимание ингибирующий эффект абиратерона и D4A по отношению к основным ферментам пути биосинтеза андрогенов из холестерина, можно

102

предположить, что вероятность повышения продукции тестостерона за счёт ингибирования СҮР19А1 D4A относительно мала. С другой стороны, вероятное снижение уровня эстрогенов как следствие фармакотерапии абиратероном и ингибиторами стероид 5α-редуктазы с целью аккумулирования D4A может приводить к побочным эффектам, таким как повышение костной резорбции, снижение памяти и нарушения углеводного и липидного обменов [124, 125].

3.5. Исследование кортизол-гидроксилазной активности СҮРЗА4 в присутствии абиратерона

СҮРЗА4 катализирует 6β-гидроксилирование кортизола. Соотношение концентрации субстрата этой реакции к концентрации продукта в биологических жидкостях используется для оценки активности фермента *in vivo* [126, 127]. Кортизол также используется как маркёрный субстрат при определении каталитической активности СҮРЗА4 в модельных системах [128]. Изменение СҮРЗА4-зависимого метаболизма стероидных гормонов может сказаться на прогрессии рака предстательной железы, особенно в случае наличия мутантных форм рецептора андрогенов в клетках опухоли.

СҮРЗА4-зависимое Для исследования абиратерона влияния на гидроксилирование кортизола как маркёрного субстрата, обладающего стероидной структурой, использовался подход, основанный на флуорометрическом определении субстрата и продукта реакции (кортизола и 6β-гидроксикортизола, соответственно) после обработки смесью серной кислоты: этанола (3:1). Стандартные растворы 100 мкМ кортизола и 100 мкМ 6β-гидроксикортизола в 300 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 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 мин при комнатной температуре. Спектры флуоресценции полученных растворов были измерены при длине волны возбуждения 365 нм

103

в диапазоне длин волн эмиссии 400-600 нм. Было установлено, что пик эмиссии при длине волны 525 ± 2 нм соответствует кортизолу, а при длине волны 427 ± 2 нм – 6 β -гидроксикортизолу (рис. 55).



Рис. 55. Спектры флуоресценции 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% метанола по объёму и 100 мкМ 6βгидроксикортизол (—) или 100 мкМ 100 мкМ кортизол (–––), после обработки смесью серной кислоты:этанола (3:1) при длине волны возбуждения 365 нм в кварцевой кювете объёмом 350 мкл.

Зависимость интенсивности флуоресценции при длине волны 427 нм от концентрации 6 β -гидроксикортизола была линейна в диапазоне от 1 до 10 мкМ и подчинялась уравнению y = 2,0828x с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,995$ (рис. 56). Диапазон концентраций 6 β -гидроксикортизола соответствует 300-3000 пмоль вещества в 300 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl и 1% метанола по объёму, что было в дальнейшем использовано для расчёта скорости электрокаталитической гидроксилазной активности СҮРЗА4 по отношению к кортизолу.



Рис. 56. Спектры флуоресценции растворов, содержащих различные концентрации 6 β -гидроксикортизола после обработки смесью серной кислоты:этанола (3:1). Образцы 300 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% метанола по объёму и различные количества 6 β -гидроксикортизола (0-3000 пмоль) инкубировались с 600 мкл смеси серной кислоты:этанола (3:1) при комнатной температуре в течение 10 минут. Спектры регистрировались при длине волны возбуждения 365 нм в кварцевой кювете объёмом 350 мкл. На вставке представлена зависимость интенсивности флуоресценции при длине волны эмиссии 427 ± 2 нм от количества 6 β -гидроксикортизола в образце.

Для анализа гидроксилазной активности СҮРЗА4 по отношению к кортизолу была использована электрохимическая система на основе СҮРЗА4, иммобилизованного на модифицированном ДДАБ печатном графитовом электроде.

Начальные скорости 6β-гидроксилирования кортизола под действием СҮРЗА4 при концентрациях субстрата 5; 10; 15; 17,5; 30; 50 или 100 мкМ в электрохимической системе были рассчитаны из зависимостей количества образовавшегося 6β-гидроксикортизола от времени электрокаталитической реакции. На рисунке 57 представлены спектры флуоресценции при длине волны возбуждения 365 нм, полученные после обработки двойным объёмом смеси серной кислоты: этанола (3:1) образцов после электрокаталитической реакции, проводимого в течение различного времени, по отношению к 100 мкМ кортизолу. Спектр флуоресценции образца после обработки двойным объёмом смеси серной кислоты: этанола (3:1) после безферментной электрокаталитической реакции по отношению к 100 мкМ кортизолу в течение 60 минут также представлен на рисунке 57. Последний содержит два пика – при длине волны эмиссии 430 ± 1 нм и при длине волны эмиссии 525 ± 2 нм, соответствующей флуоресценции образца, содержащего кортизол. Зависимость концентрации образовавшегося 6β-гидроксикортизола ОТ времени ферментативного электрокаталитической реакции имеет гиперболический характер.



Рис. 57. Спектры флуоресценции образцов, содержащих 100 мМ калийфосфатный буфер (pH 7,4), 50 мМ NaCl, 1% метанола по объёму и 100 мкМ кортизол, после электрокаталитической реакции в течение различного времени (5-60 минут) и последующей обработки двойным объёмом смеси серной кислоты: этанола (3:1). Электрокаталитическая реакция проводилась с использованием печатного графитового электрода, модифицированного ДДАБ, без (—) или с иммобилизованным СҮРЗА4 при фиксированном значении потенциала рабочего электрода -600 мВ (отн. Ag/AgCl). Спектры флуоресценции регистрировались при длине волны возбуждения 365 нм в кварцевой кювете объёмом 350 мкл. На вставке представлена зависимость образовавшегося количества 6β-гидроксикортизола времени OT ферментативной электрокаталитической реакции.

гиперболическая скорости Была получена зависимость СҮРЗА4-зависимого образования 6βэлектрокаталитического субстрата гидроксикортизола от концентрации (кортизола) В электрохимической системе в соответствии с теорией ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен (рис. 58).

107



Рис. 58. Зависимость начальной скорости СҮРЗА4-зависимого образования 6β-гидроксикортизола от концентрации кортизола (0–100 мкМ) в электрохимической системе. Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Параметры стационарной кинетики реакции (максимальная скорость реакции (V_{max}) и константа Михаэлиса (K_{M})) были рассчитаны на основе анализа полученной зависимости как 89 ± 5 нмоль 6β-гидроксикортизола в мин на нмоль электроактивного фермента и 10 ± 2 мкМ кортизола, соответственно. Ранее K_{M} СҮРЗА4-зависимого 6β-гидроксилирования кортизола было рассчитано как 15,2 ± 2,1 мкМ [129], при этом в микросомальной системе с высокоэкспрессированным рекомбинантным СҮРЗА4 значение V_{max} составило 27 ± 2 пмоль 6β-гидроксикортизола в мин на пмоль СҮРЗА4, а значение $K_{\text{M}} - 148 \pm 25$ мкМ [128].

С помощью разработанного метода анализа кортизол-гидроксилазной активности СҮРЗА4 показано, что абиратерон ингибирует 6β-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 6β-гидроксилазную активность СҮРЗА4, значение IC₅₀ при данных условиях было определено как 114 ± 46 нМ (рис. 59). Для сравнения, при тех же условиях известный ингибитор СҮРЗА4 – кетоконазол ингибирует 6β-гидроксилазную активность фермента со значением IC₅₀ равным 70 ± 5 нМ.



Рис. 59. Зависимость остаточной гидроксилазной активности СҮРЗА4 по отношению к 50 мкМ гидрокортизону в присутствии различной концентрации абиратерона в системе (от 1 нМ до 50000 нМ). Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Таким образом, выявлены ингибиторные свойства абиратерона по отношению к СҮРЗА4-зависимому метаболизму кортизола. Снижение метаболизма стероидных гормонов под действием СҮРЗА4 может приводить к повышению уровня прогрессии рака предстательной железы, особенно в случае наличия мутантных форм рецептора андрогенов в клетках опухоли.

3.6. Определение электрокаталитической монооксигеназной активности СҮРЗА4 по отношению к абиратерону

Ранее было показано, что абиратерон является субстратом СҮРЗА4 [2]. Как было установлено в рамках диссертационной работы, абиратерон также свойства проявляет субстратные CYP3A4 ПО отношению к В электрохимической системе основе рекомбинантного CYP3A4, на иммобилизованного на поверхности модифицированного ДДАБ печатного графитового электрода. После СҮРЗА4-зависимой электрокаталитической реакции по отношению к абиратерону с помощью метода масс-спектрометрии были обнаружены пики с *m/z* 366,2422, соответствующим теоретически рассчитанному m/z моногидроксилированного производного абиратерона 366,2428 ([C₂₄H₃₁NO₂ + H⁺]) (рис. 60).



Рис. 60. Фрагменты масс-спектров инкубационной смеси после СҮРЗА4зависимой реакции по отношению к 50 мкМ абиратерону в диапазонах m/z, соответствующих m/z абиратерона и его моногидроксилированного производного.

Соотношение интенсивности пика с *m/z* 366,2422, соответствующим пику моногидроксилированного производного абиратерона, к интенсивности пика

с m/z 350,2473 было рассчитано как 0,0045 ± 0,0009, при этом эритромицин, использованный в качестве потенциального ингибитора, в диапазоне концентраций от 10 нМ до 100 мкМ не изменял это соотношение, что указывает на отсутствие ингибиторных свойств эритромицина по отношению к СҮРЗА4-зависимому электрокаталитическому моногидроксилированию абиратерона.

3.7. Исследование субстрат-ингибиторных свойств галетерона по отношению к СҮРЗА4

факт, Принимая BO внимание тот что абиратерон индуцирует спектральные изменения СҮРЗА4 II (ингибиторного) типа, при этом способен окисляться при участии этого фермента, предположено, что и галетерон может также проявлять субстратные свойства по отношению к данному ферменту. Возможные субстратные свойства галетерона были исследованы с помощью электрохимической системы на основе иммобилизованного на электроде СҮРЗА4. Анализ продуктов СҮРЗА4-зависимой реакции по отношению к галетерону проводился методом масс-спектрометрии. Основываясь на данных спектрального молекулярного было анализа И докинга, сделано предположение, что галетерон окисляется по одному из атомов азота бензимидазольного фрагмента с образованием N-оксида галетерона. Массспектрометрический 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/z405,2529 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 отсутствии фермента на электроде составило 0.03 ± 0.02 . Таким образом, можно говорить о том, что в электрохимической системе происходит N-

окисление галетерона как в присутствии, так и в отсутствии 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 СҮРЗА4, либо на медленное окисление галетерона при участии данного фермента.

Суммируя полученные экспериментальные результаты о взаимодействии галетерона с СҮРЗА4, можно заключить, что данный препарат является лигандом II спектрального типа, образующим комплекс с СҮРЗА4 за счёт взаимодействия атома азота бензимидазольного радикала с ионом железа гема, а также за счёт слабых взаимодействий стероидного фрагмента с аминокислотными остатками апобелка. Основываясь на значениях K_s, можно говорить о том, что образование комплекса СҮРЗА4 с галетероном происходит примерно в 2 раза менее эффективно по сравнению с абиратероном. В электрохимической системе на основе СҮРЗА4 не удалось зафиксировать выраженные субстратные свойства галетерона. Основываясь на полученном значении $K_{\rm S}$ комплекса СҮРЗА4 с галетероном, можно говорить 0 возможном участии галетерона В межлекарственных взаимодействиях на уровне СҮРЗА4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано взаимодействие противоопухолевых соединений абиратерона, D4A, галетерона и D4G – с потенциальными молекулярными мишенями среди стероид-метаболизирующих изоферментов цитохрома Р450 (CYP21A2, CYP51A1, CYP11A1, CYP19A1, CYP3A4). Используя комплексный поход, включающий методы абсорбционной спектроскопии, кинетического анализа И молекулярного докинга, для исследуемых противоопухолевых соединений выявлены новые молекулярные мишени среди стероид-метаболизирующих изоферментов цитохрома Р450.

Исследовано взаимодействие абиратерона, D4A, галетерона и D4G с CYP51A1. исследуемые соединения Показано, что все вызывают субстратного спектральные изменения типа. При ЭТОМ выявлена гидроксилазная активность СҮР51А1 по отношению к абиратерону и галетерону. Полученные результаты позволяют сделать предположение о возможном участии СҮР51А1 в биотрансформации исследуемых соединений и образовании в результате этого процесса метаболитов с изменённой фармакологической активностью.

Выявлено, что только абиратерон способен связываться с СҮР11А1, что косвенно указывает на меньшую вероятность проявления побочных эффектов на уровне этого фермента при использовании D4A, галетерона или D4G для лечения рака предстательной железы.

Исследованы взаимодействия D4A, галетерона и D4G с CYP21A2 с помощью абсорбционной спектроскопии. D4A вызывал спектральные изменения фермента II типа, что, по-видимому, вызвано образованием координационной связи между азотом пиридинового радикала D4A и ионом железа гема 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 с помощью метода Диксона. Зависимости обратных начальных скоростей CYP21A2-зависимого 21-

гидроксилирования прогестерона (1/V) от концентраций D4A линейны и имеют точку пересечения во втором квадранте плоскости координат, что указывает на конкурентный или смешанный тип ингибирования. Константа ингибирования D4A по отношению к CYP21A2 была определена как $1,8 \pm 0,8$ мкM, что схоже со значением константы ингибирования для абиратерона по отношению к СУР21А2 (2,26 мкМ [11]). Галетерон и D4G вызывали спектральные изменения фермента I типа, что может свидетельствовать как об их способности подвергаться окислению под действием СҮР21А2, так и об ингибировании галетероном и D4G этого изофермента цитохрома P450. Ингибиторная активность галетерона и D4G по отношению к 21-гидроксилированию прогестерона, катализируемому СҮР21А2, была исследована с помощью СҮР21А2-содержащей реконструированной монооксигеназной системы. Установлено, что галетерон проявляет свойства конкурентного ингибитора с константой ингибирования равной 12 ± 3 мкМ по отношению к СУР21А2, тогда как D4G в диапазоне концентраций, сопоставимых с предполагаемой терапевтической дозой препарата, не проявлял ингибиторных свойств по отношению к этому изоферменту цитохрома Р450.

Установлено, что с активным центром ключевого фермента биосинтеза эстрогенов – CYP19A1 (ароматазы) – может взаимодействовать из всех исследуемых соединений только D4A. Обнаружена ингибиторная активность D4A по отношению к CYP19A1 (IC₅₀ = $7,5 \pm 1,1$ мкМ). Таким образом, можно говорить о возможном изменении биосинтеза эстрогенов как в опухолевой, так и здоровой ткани и неоднозначном влиянии такого изменения на опухолевую прогрессию при использовании стратегии аккумулирования D4A в организме пациентов с раком предстательной железы, что даёт предпосылки для дальнейших исследований.

С помощью дифференциальной абсорбционной спектроскопии показано взаимодействие СҮРЗА4 с абиратероном, галетероном и D4A по II (ингибиторному) типу. Такое взаимодействие с высокой долей вероятности может обуславливать как изменение фармакологической активности самих

противоопухолевых соединений, так И развитие межлекарственных взаимодействий на уровне СҮРЗА4. С помощью разработанного в рамках диссертационной работы нового метода определения каталитической активности СҮРЗА4 в электрохимической системе выявлены ингибиторные свойства абиратерона по отношению к кортизол-гидроксилазной активности фермента. Разработан новый оригинальный метод анализа кортизолгидроксилазной активности CYP3A4 В электрохимической системе, основанный на флуоресцентном анализе продукта реакции 6β-Данный метод гидроксикортизола. применялся для исследования ингибиторных свойств абиратерона по отношению к СҮРЗА4. Показано, что абиратерон вызывает ингибирование кортизол-гидроксилазной активности СҮРЗА4 с величиной IC₅₀ 114 \pm 46 нМ (при концентрации кортизола 50 мкМ).

Полученные результаты позволяют расширить представления о фармакокинетике И фармакологическом эффекте противоопухолевых соединений, использующихся в настоящее время при лечении рака предстательной железы или находящихся на стадии исследований в качестве потенциальных препаратов, спрогнозировать возможные побочные действия и оптимизировать применение данной группы препаратов в клинической практике.

Ингибиторные активности абиратерона, галетерона и их 3-кето- $\Delta 4$ метаболитов по отношению к ключевым ферментам стероидогенеза представлены на рисунке 61.



Рис. 61. Схема стероидогенеза с указанием ингибиторных активностей абиратерона, галетерона и их 3-кето- $\Delta 4$ -метаболитов. Установленные в настоящей работе данные обозначены подчёркиванием. Прогестогены обозначены красным, кортикостероиды – зелёным, андрогены – синим, эстрогены – розовым.

выводы

1. Ингибиторы цитохрома P450 17A1 – абиратерон, галетерон и соответствующие 3-кето- Δ 4-метаболиты (D4A и D4G) – в диапазоне концентраций 1-15 мкМ взаимодействуют с активным центром СУР21A2, 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 СУР21A2; D4A и галетерон ингибируют СУР21A2 (K_i 1,8 ± 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 ± 1,1 мкМ;

5. Абиратерон, D4A и галетерон (в диапазоне концентраций 1-15 мкМ) индуцируют спектральные изменения СҮРЗА4 II (ингибиторного) типа. Абиратерон ингибирует СҮРЗА4-зависимое 6β-гидроксилирование 50 мкМ

кортизола с IC₅₀ 114 \pm 46 нМ. Для галетерона, в отличие от абиратерона, не выявлено субстратных свойств по отношению к СУРЗА4.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

В работе использованы символы и сокращения аминокислот, в соответствии с рекомендациями Комиссии по номенклатуре Международного союза чистой и прикладной химии (IUPAC) и Международного Союза Биохимиков и Молекулярных Биологов (IUBMB), а также следующие обозначения:

- ДДАБ дидодецилдиметиламмония бромид
- ДМСО диметилсульфоксид
- ПГЭ печатный графитовый электрод
- ЭР-а эстрогеновый рецептор а
- ЭР-β эстрогеновый рецептор β
- APP предшественник β-амилоида (англ. amyloid precursor protein)
- AR-V7 сплайс-вариант 7 андрогенового рецептора
- СНАРЅ 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат
- СҮР цитохром Р450
- СҮР2С8 цитохром Р450 2С8
- СҮР2D6 цитохром Р450 2D6
- СҮРЗА4 цитохром Р450 ЗА4

СҮР11А1 – цитохром Р450 11А1, 20,22-десмолаза, фермент, расщепляющий боковую цепь холестерина

- СҮР11В1 цитохром Р450 11В1, 11β-гидроксилаза
- СҮР11В2 цитохром Р450 11В2, альдостеронсинтаза
- СҮР17А1 цитохром Р450 17А1, 17а-гидроксилаза, 17,20-лиаза
- СҮР19А1 цитохром Р450 19А1, ароматаза
- СҮР21А2 цитохром Р450 21А2, 21-гидроксилаза
- СҮР51А1 цитохром Р450 51А1, ланостерин 14а-деметилаза
- D4A 3-кето-Δ4-метаболит абиратерона
- D4G-3-кето- $\Delta 4$ -метаболит галетерона
- FOXP1 фактор транскрипции (англ. forkhead box protein P1)

GPR30 – сопряжённый с G-белком рецептор эстрогенов 30 (англ. G-protein coupled receptor 30)

h – коэффициент Хилла

Hsp90 – белок теплового шока 90 (англ. heat shock protein 90)

IC₅₀ – концентрация ингибитора, при которой активность фермента снижается вдвое

*K*_i – константа ингибирования

Км – 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

PDB – база данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот (англ.

Protein Data Bank)

R² – коэффициент детерминации

SRD5А – стероид-5а-редуктаза

SRD5B – стероид-5β-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

ΔH – изменение энтальпии

3а-HSD – 3а-гидроксистероид дегидрогеназа

 3β -HSD – 3β -гидроксистероиддегидрогеназа

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

 Alex A.B., Pal S.K., Agarwal N. CYP17 inhibitors in prostate cancer: latest evidence and clinical potential // Ther. Adv. Med. Oncol. – 2016. – V. 8. – № 4. – P. 267-275.

2. Li Z., Bishop A.C., Alyamani M., GarciaJ.A., Dreicer R., Bunch D., Liu J., Upadhyay S.K., Auchus R.J., Sharifi N. Conversion of abiraterone to D4A drives anti-tumour activity in prostate cancer // Nature. – 2015. – V. 523. – P. 347-351.

 Yoshimoto F.K., Auchus R.J. The diverse chemistry of cytochrome P450 17A1 (P450c17, CYP17A1) // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2015. – V. 151. – P. 52-65.

4. Attard G., Reid A.H., Auchus R.J., Hughes B.A., Cassidy A.M., Thompson E., Oommen N.B., Folkerd E., Dowsett M., Arlt W., de Bono J.S. Clinical and biochemical consequences of CYP17A1 inhibition with abiraterone given with and without exogenous glucocorticoids in castrate men with advanced prostate cancer // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2012. – V. 97. – No 2. – P. 507-516.

5. Li Z., Alyamani M., Li J., Rogacki K., Abazeed M., Upadhyay S.K., Balk S.P., Taplin M.E., Auchus R.J., Sharifi N. Redirecting abiraterone metabolism to finetune prostate cancer anti-androgen therapy. – Nature. – 2016. – V. 533. – № 7604. – 547-551.

Garrido M., Peng H.M., Yoshimoto F.K., Upadhyay S.K., Bratoeff E., Auchus R.J. A-ring modified steroidal azoles retaining similar potent and slowly reversible CYP17A1 inhibition as abiraterone // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2014. – V. 143. – P. 1-10.

7. Salvador J.A., Pinto R.M., Silvestre S.M. Steroidal 5 α -reductase and 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) inhibitors useful in the treatment of prostatic diseases // J. Steroid Biochem. Mol Biol. – 2013. – V. 137. – 199-222.

Alyamani M., Li Z., Berk M., Li J., Tang J., Upadhyay S., Auchus R.J., Sharifi N. Steroidogenic Metabolism of Galeterone Reveals a Diversity of Biochemical Activities // Cell Chem. Biol. – 2017. – V. 24. – № 7. – P. 825-832.e6.

9. Handratta V.D., Vasaitis T.S., Njar V.C., Gediya L.K., Kataria R., Chopra P., Newman D. Jr., Farquhar R., Guo Z., Qiu Y., Brodie A.M. Novel C-17-heteroaryl steroidal CYP17 inhibitors/antiandrogens: synthesis, in vitro biological activity, pharmacokinetics, and antitumor activity in the LAPC4 human prostate cancer xenograft model // J. Med. Chem. – 2005. – V. 48. – N_{2} 8. – P. 2972-84.

10. Montgomery B., Eisenberger M.A., Rettig M.B., Chu F., Pili R., Stephenson J.J., Vogelzang N.J., Koletsky A.J., Nordquist L.T., Edenfield W.J., Mamlouk K., Ferrante K.J., Taplin M.-E. Androgen Receptor Modulation Optimized for Response (ARMOR) Phase I and II Studies: Galeterone for the Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer // Clin. Cancer Res. -2016. - V. 22. - N = 6. - P. 1356-1363.

 Malikova J., Brixius-Anderko S., Udhane S.S., Parween S., Dick B., Bernhardt R., Pandey A.V. CYP17A1 inhibitor abiraterone, an anti-prostate cancer drug, also inhibits the 21-hydroxylase activity of CYP21A2 // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2017. – V. 174. – P. 192-200.

12. Hu Q., Yin L., Jagusch C., Hille U.E., Hartmann R.W. Isopropylidene Substitution Increases Activity and Selectivity of Biphenylmethylene 4-Pyridine Type CYP17 Inhibitors // J. Med. Chem. – 2010. – V. 53. – N_{2} 13. – P. 5049-5053. 13. Yin L., Hu Q. CYP17 inhibitors—abiraterone, C17,20-lyase inhibitors and multi-targeting agents // Nat. Rev. Urol. – 2014. – V. 11. – N_{2} 1. – P. 32-42.

14. Lepesheva G.I., Waterman M.R. Sterol 14alpha-demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – V.
1770. – № 3. – P. 467-477.

15. Hargrove T.Y., Friggeri L., Wawrzak Z., Sivakumaran S., Yazlovitskaya E.M., Hiebert S.W., Guengerich F.P., Waterman M.R., Lepesheva G.I. Human sterol 14 α -demethylase as a target for anticancer chemotherapy: towards structure-aided drug design // The Journal of Lipid Research. – 2016. – V. 57. – No 8. – P. 1552-1563.

16. Bosland M.C., Mahmoud A.M. Hormones and prostate carcinogenesis: Androgens and estrogens // J. Carcinog. -2011. - V. 10. - P. 33. 17. Dobbs R.W., Malhotra N.R., Greenwald D.T., Wang A.Y., Prins G.S., Abern M.R. Estrogens and prostate cancer // Prostate Cancer Prostatic Dis. -2019. - V.22. $- N_{2} 2. - P. 185-194.$

18. Ellem S.J., Risbridger G.P. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate
// Ann. N. Y. Acad. Sci. - 2009. - V. 1155. - P. 174-186.

19. Hu Q., Hartmann R.W. The renaissance of CYP17 inhibitors for the treatment of prostate cancer // Cancer drug design and discovery / edited by Neidle S. – 2nd edition. – London: Academic Press, 2014. – Ch. 11. – P. 319-365.

20. Udhane S.S., Dick B., Hu Q., Hartmann R.W., Pandey A.V. Specificity of anti-prostate cancer CYP17A1 inhibitors on androgen biosynthesis // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2016. – V. 477. – \mathbb{N} 4. – P. 1005-1010.

21. Guengerich, F.P. Human Cytochrome P450 Enzymes // Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry / edited by P. R. Ortiz de Montellano. – 4th edition. – University of California, San Francisco, San Francisco California USA, 2015. – Part II, V. 2, Ch. 9. – P. 523-786.

22. van Leenders G.J., Schalken J.A. Epithelial cell differentiation in the human prostate epithelium: implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer // Crit. Rev. Oncol. Hematol. $-2003. - V.46. - N_{\odot}$ Supplement. -P.3-10.

23. Shen M.M., Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges // Genes Dev. – 2010. – V. 24. № 18. – P. 1967-2000.

24. Wang X., Kruithof-de Julio M., Economides K.D., Walker D., Yu H., Halili M.V., Hu Y.P., Price S.M., Abate-Shen C., Shen M.M. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer // Nature. $-2009. - V.461. - N_{2}7263. - P.495-500.$

25. Wang Z.A., Mitrofanova A., Bergren S.K., Abate-Shen C., Cardiff R.D., Califano A., Shen M.M. Lineage analysis of basal epithelial cells reveals their unexpected plasticity and supports a cell-of-origin model for prostate cancer heterogeneity // Nat. Cell Biol. – 2013. – V. 15. – N_{2} 3. – P. 274-283.

26. Choi N., Zhang B., Zhang L., Ittmann M., Xin L. Adult murine prostate basal and luminal cells are self-sustained lineages that can both serve as targets for prostate cancer initiation // Cancer Cell. $-2012. - V. 21. - N_{2} 2. - P. 253-265.$

27. Yoo Y.A., Roh M., Naseem A.F., Lysy B., Desouki M.M., Unno K., Abdulkadir S.A. Bmi1 marks distinct castration-resistant luminal progenitor cells competent for prostate regeneration and tumour initiation // Nat. Commun. – 2016. – V. 7. – P. 12943.

28. Lawson D.A., Xin L., Lukacs R.U., Cheng D., Witte O.N. Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. $-2007. - V. 104. - N_{2} 1. - P. 181-186.$

29. Lawson D.A., Zong Y., Memarzadeh S., Xin L., Huang J., Witte O.N. Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -2010. - V. 107. - N = 6. - P. 2610-2615.

30. Goldstein A.S., Huang J., Guo C., Garraway I.P., Witte O.N. Identification of a cell of origin for human prostate cancer // Science. – 2010. – V. 329. – № 5991. –
P. 568-571.

31. Wang Z.A., Toivanen R., Bergren S.K., Chambon P., Shen M.M. Luminal cells are favored as the cell of origin for prostate cancer // Cell Rep. -2014. -V. 8. $-N_{2}$ 5. -P. 1339-1346.

32. Smith B.A., Sokolov A., Uzunangelov V., Baertsch R., Newton Y., Graim K., Mathis C., Cheng D., Stuart J.M., Witte O.N. A basal stem cell signature identifies aggressive prostate cancer phenotypes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2015. – V. 112. – N_{2} 47. – P. E6544-6552.

33. Shen M.M., Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges // Genes Dev. $-2010. - V. 24. - N_{2} 18. - P. 1967-2000.$ 34. Gleason D.F., Mellinger G.T. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging // J. Urol. $-1974. - V. 111. - N_{2} 1. - P. 58-64.$

35. Huggins C., Hodges C.V. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic

carcinoma of the prostate // CA Cancer J. Clin. – 1972. – V. 22. – № 4. – P. 232-240.

36. Mostaghel E.A., Solomon K.R., Pelton K., Freeman M.R., Montgomery R.B. Impact of circulating cholesterol levels on growth and intratumoral androgen concentration of prostate tumors // PLoS One. $-2012. - V.7. - N_{2} 1. - P. e30062.$

37. Hamid A.R., Pfeiffer M.J., Verhaegh G.W., Schaafsma E., Brandt A., Sweep F.C., Sedelaar J.P., Schalken J.A. Aldo-keto reductase family 1 member C3 (AKR1C3) is a biomarker and therapeutic target for castration-resistant prostate cancer // Mol. Med. $-2013. - V. 18. - N_{\rm O} 1. - P. 1449-1455.$

38. Armandari I., Hamid A.R., Verhaegh G., Schalken J. Intratumoral steroidogenesis in castration-resistant prostate cancer: a target for therapy // Prostate Int. $-2014. - V. 2. - N_{2} 3. - P. 105-113.$

39. Fujita K., Nonomura N. Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review // World J. Mens Health. – 2019. – V. 37. – № 3. – P. 288-295.

40. Beilin J., Ball E.M., Favaloro J.M., Zajac J.D. Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines // J. Mol. Endocrinol. -2000. - V. 25. - P. 85-96.

41. Giovannucci E., Stampfer M.J., Krithivas K., Brown M., Dahl D., Brufsky A., Talcott J., Hennekens C.H., Kantoff P.W. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – V. 94. – N_{2} 7. – P. 3320-3323.

42. Takayama K., Inoue S. Transcriptional network of androgen receptor in prostate cancer progression // Int. J. Urol. -2013 - V. 20 - P. 756-768.

43. Taplin S.H., Barlow W., Urban N., Mandelson M.T., Timlin D.J., Ichikawa L., Nefcy P. Stage, age, comorbidity, and direct costs of colon, prostate, and breast cancer care // J. Natl. Cancer Inst. -1995. - V. 87. - N = 6. - P. 417-426.

44. Visakorpi T., Hyytinen E., Koivisto P., Tanner M., Keinänen R., Palmberg C., Palotie A., Tammela T., Isola J., Kallioniemi O.P. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer // Nat. Genet. – 1995. – V. 9. – N_{2} 4. – P. 401-406.

45. Hodgson M.C., Astapova I., Cheng S., Lee L.J., Verhoeven M.C., Choi E., Balk S.P., Hollenberg A.N. The androgen receptor recruits nuclear receptor CoRepressor (N-CoR) in the presence of mifepristone via its N and C termini revealing a novel molecular mechanism for androgen receptor antagonists // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280. – No 8. – P. 6511-6519.

46. Taylor B.S., Schultz N., Hieronymus H., Gopalan A., Xiao Y., Carver B.S., Arora V.K., Kaushik P., Cerami E., Reva B., Antipin Y., Mitsiades N., Landers T., Dolgalev I., Major J.E., Wilson M., Socci N.D., Lash A.E., Heguy A., Eastham J.A., Scher H.I., Reuter V.E., Scardino P.T., Sander C., Sawyers C.L., Gerald W.L. Integrative genomic profiling of human prostate cancer // Cancer Cell. – 2010. – V. $18. - N_{2} 1. - P. 11-22.$

47. Henzler C., Li Y., Yang R., McBride T., Ho Y., Sprenger C., Liu G., Coleman I., Lakely B., Li R., Ma S., Landman S.R., Kumar V., Hwang T.H., Raj G.V., Higano C.S., Morrissey C., Nelson P.S., Plymate S.R., Dehm S.M. Truncation and constitutive activation of the androgen receptor by diverse genomic rearrangements in prostate cancer // Nat. Commun. -2016. - V. 7. - P. 13668.

48. Antonarakis E.S., Lu C., Wang H., Luber B., Nakazawa M., Roeser J.C., Chen Y., Mohammad T.A., Chen Y., Fedor H.L., Lotan T.L., Zheng Q., De Marzo A.M., Isaacs J.T., Isaacs W.B., Nadal R., Paller C.J., Denmeade S.R., Carducci M.A., Eisenberger M.A., Luo J. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer // N. Engl. J. Med. – 2014. – V. 371. – N_{2} 11. – P. 1028-1038.

49. Zhao X.Y., Malloy P.J., Krishnan A.V., Swami S., Navone N.M., Peehl D.M., Feldman D. Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor // Nat. Med. -2000. - V. 6. - N = 6. - P. 703-706.

50. Zhang C., Wang L., Wu D., Chen H., Chen Z., Thomas-Ahner J.M., Zynger D.L., Eeckhoute J., Yu J., Luo J., Brown M., Clinton S.K., Nephew K.P., Huang T.H., Li W., Wang Q. Definition of a FoxA1 Cistrome that is crucial for G1 to S-phase cell-cycle transit in castration-resistant prostate cancer // Cancer Res. – 2011. – V. 71. – N_{2} 21. – P. 6738-6748.

51. Barbieri C.E., Baca S.C., Lawrence M.S., Demichelis F., Blattner M., Theurillat J.P., White T.A., Stojanov P., Van Allen E., Stransky N., Nickerson E., Chae S.S., Boysen G., Auclair D., Onofrio R.C., Park K., Kitabayashi N., MacDonald T.Y., Sheikh K., Vuong T., Guiducci C., Cibulskis K., Sivachenko A., Carter S.L., Saksena G., Voet D., Hussain W.M., Ramos A.H., Winckler W., Redman M.C., Ardlie K., Tewari A.K., Mosquera J.M., Rupp N., Wild P.J., Moch H., Morrissey C., Nelson P.S., Kantoff P.W., Gabriel S.B., Golub T.R., Meyerson M., Lander E.S., Getz G., Rubin M.A., Garraway L.A. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer // Nat. Genet. – 2012. - V. 44. - N = 6. - P. 685-689.

52. Grasso C.S., Wu Y.M., Robinson D.R., Cao X., Dhanasekaran S.M., Khan A.P., Quist M.J., Jing X., Lonigro R.J., Brenner J.C., Asangani I.A., Ateeq B., Chun S.Y., Siddiqui J., Sam L., Anstett M., Mehra R., Prensner J.R., Palanisamy N., Ryslik G.A., Vandin F., Raphael B.J., Kunju L.P., Rhodes D.R., Pienta K.J., Chinnaiyan A.M., Tomlins S.A. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer // Nature. $-2012. - V.487. - N_{2}7406. - P.239-243.$

53. Dobbs R.W., Malhotra N.R., Greenwald D.T., Wang A.Y., Prins G.S., Abern
M.R. Estrogens and prostate cancer // Prostate Cancer Prostatic Dis. – 2019. – V.
22. – № 2. – P. 185-194.

54. Carruba G. Estrogen and prostate cancer: an eclipsed truth in an androgendominated scenario // J. Cell Biochem. – 2007. – V. 102. – № 4. – P. 899-911.

55. Risbridger G.P., Bianco J.J., Ellem S.J., McPherson S.J. Oestrogens and prostate cancer // Endocr. Relat. Cancer. – 2003. – V. 10. – № 2. – P. 187-191.

56. Nelles J.L., Hu W.Y., Prins G.S. Estrogen action and prostate cancer // Expert Rev. Endocrinol. Metab. – 2011. – V. 6. – № 3. – P. 437-451.

57. Hu W.Y., Shi G.B., Lam H.M., Hu D.P., Ho S.M., Madueke I.C., Kajdacsy-Balla A., Prins G.S. Estrogen-initiated transformation of prostate epithelium derived from normal human prostate stem-progenitor cells // Endocrinology. – 2011. – V. 152. – N_{2} 6. – P. 2150-2163.

58. Bonkhoff H., Fixemer T., Hunsicker I., Remberger K. Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions // Am. J. Pathol. – 1999. – V. 155. – N_{2} 2. – P. 641-647.

59. Leav I., Lau K.M., Adams J.Y., McNeal J.E., Taplin M.E., Wang J., Singh H., Ho S.M. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma // Am. J. Pathol. $-2001. - V. 159. - N_{\rm o} 1. - P. 79-92.$

60. Risbridger G.P., Ellem S.J., McPherson S.J. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling // J. Mol. Endocrinol. – $2007. - V. 39. - N_{2} 3. - P. 183-188.$

61. Warner M., Huang B., Gustafsson J.A. Estrogen Receptor β as a Pharmaceutical Target / Trends Pharmacol. Sci. – 2017. – V. 38. – No 1. – P. 92-99. 62. Di Zazzo E., Galasso G., Giovannelli P., Di Donato M., Castoria G. Estrogens and Their Receptors in Prostate Cancer: Therapeutic Implications // Front. Oncol. – 2018. – V. 8. – P. 2.

63. Liu M.M., Albanese C., Anderson C.M., Hilty K., Webb P., Uht R.M., Price R.H. Jr., Pestell R.G., Kushner P.J. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277. – N_{2} 27. – P. 24353-24360.

64. Mal R., Magner A., David J., Datta J., Vallabhaneni M., Kassem M., Manouchehri J., Willingham N., Stover D., Vandeusen J., Sardesai S., Williams N., Wesolowski R., Lustberg M., Ganju R.K., Ramaswamy B., Cherian M.A. Estrogen Receptor Beta (ER β): A Ligand Activated Tumor Suppressor // Front. Oncol. – 2020. – V. 10. – P. 587386.

65. Lu W., Katzenellenbogen B.S. Estrogen Receptor-β Modulation of the ERαp53 Loop Regulating Gene Expression, Proliferation, and Apoptosis in Breast Cancer // Horm. Cancer. – 2017. – V. 8. – N_{2} 4. – P. 230-242.

66. Haffner M.C., Mosbruger T., Esopi D.M., Fedor H., Heaphy C.M., Walker D.A., Adejola N., Gürel M., Hicks J., Meeker A.K., Halushka M.K., Simons J.W., Isaacs W.B., De Marzo A.M., Nelson W.G., Yegnasubramanian S. Tracking the

clonal origin of lethal prostate cancer // J. Clin. Invest. – 2013. – V. 123. – № 11. – P. 4918-4922.

67. Hong M.K., Macintyre G., Wedge D.C., Van Loo P., Patel K., Lunke S., Alexandrov L.B., Sloggett C., Cmero M., Marass F., Tsui D., Mangiola S., Lonie A., Naeem H., Sapre N., Phal P.M., Kurganovs N., Chin X., Kerger M., Warren A.Y., Neal D., Gnanapragasam V., Rosenfeld N., Pedersen J.S., Ryan A., Haviv I., Costello A.J., Corcoran N.M., Hovens C.M. Tracking the origins and drivers of subclonal metastatic expansion in prostate cancer // Nat. Commun. – 2015. – V. 6. – P. 6605.

68. Gundem G., Van Loo P., Kremeyer B., Alexandrov L.B., Tubio J.M.C., Papaemmanuil E., Brewer D.S., Kallio H.M.L., Högnäs G., Annala M., Kivinummi K., Goody V., Latimer C., O'Meara S., Dawson K.J., Isaacs W., Emmert-Buck M.R., Nykter M., Foster C., Kote-Jarai Z., Easton D., Whitaker H.C.; ICGC Prostate Group, Neal D.E., Cooper C.S., Eeles R.A., Visakorpi T., Campbell P.J., McDermott U., Wedge D.C., Bova G.S. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer // Nature. – 2015. – V. 520. – № 7547. – P. 353-357.

69. Litwin M.S., Tan H.J. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review // JAMA. – 2017. – V. 317. – № 24. – P. 2532-2542.

70. Quinn D.I., Sandler H.M., Horvath L.G., Goldkorn A., Eastham J.A. The evolution of chemotherapy for the treatment of prostate cancer // Ann. Oncol. – $2017. - V. 28. - N_{2} 11. - P. 2658-2669.$

71. Sumanasuriya S., De Bono J. Treatment of Advanced Prostate Cancer-A Review of Current Therapies and Future Promise // Cold Spring Harb. Perspect. Med. $-2018. - V. 8. - N_{2} 6. - P. a030635.$

72. Gomez L., Kovac J.R., Lamb D.J. CYP17A1 inhibitors in castration-resistant prostate cancer // Steroids. – 2015. – V. 95. – P. 80-87.

73. Acharya M., Bernard A., Gonzalez M., Jiao J., De Vries R., Tran N. Openlabel, phase I, pharmacokinetic studies of abiraterone acetate in healthy men // Cancer Chemother. Pharmacol. -2012. -V. 69. -N 6. -P. 1583-1590.

74. Attard G., Reid A.H., Olmos D., de Bono J.S. Antitumor activity with CYP17 blockade indicates that castration-resistant prostate cancer frequently remains hormone driven // Cancer Res. $-2009. - V. 69. - N_{\odot} 12. - P. 4937-4940.$

75. de Bono J.S., Logothetis C.J., Molina A., Fizazi K., North S., Chu L., Chi K.N., Jones R.J., Goodman O.B. Jr., Saad F., Staffurth J.N., Mainwaring P., Harland S., Flaig T.W., Hutson T.E., Cheng T., Patterson H., Hainsworth J.D., Ryan C.J., Sternberg C.N., Ellard S.L., Fléchon A., Saleh M., Scholz M., Efstathiou E., Zivi A., Bianchini D., Loriot Y., Chieffo N., Kheoh T., Haqq C.M., Scher H.I.; COU-AA-301 Investigators. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer // N. Engl. J. Med. – 2011. – V. 364. – № 21. – P. 1995-2005.

76. Ryan C.J., Smith M.R., de Bono J.S., Molina A., Logothetis C.J., de Souza P., Fizazi K., Mainwaring P., Piulats J.M., Ng S., Carles J., Mulders P.F., Basch E., Small E.J., Saad F., Schrijvers D., Van Poppel H., Mukherjee S.D., Suttmann H., Gerritsen W.R., Flaig T.W., George D.J., Yu E.Y., Efstathiou E., Pantuck A., Winquist E., Higano C.S., Taplin M.E., Park Y., Kheoh T., Griffin T., Scher H.I., Rathkopf D.E.; COU-AA-302 Investigators. Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy // N. Engl. J. Med. – 2013. – V. 368. – № 2. – P. 138-148.

77. Fizazi K., Tran N., Fein L., Matsubara N., Rodriguez-Antolin A., Alekseev B.Y., Özgüroğlu M., Ye D., Feyerabend S., Protheroe A., De Porre P., Kheoh T., Park Y.C., Todd M.B., Chi K.N.; LATITUDE Investigators. Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer // N. Engl. J. Med. – $2017. - V. 377. - N_{2} 4. - P. 352-360.$

78. James N.D., de Bono J.S., Spears M.R., Clarke N.W., Mason M.D., Dearnaley D.P., Ritchie A.W.S., Amos C.L., Gilson C., Jones R.J., Matheson D., Millman R., Attard G., Chowdhury S., Cross W.R., Gillessen S., Parker C.C., Russell J.M., Berthold D.R., Brawley C., Adab F., Aung S., Birtle A.J., Bowen J., Brock S., Chakraborti P., Ferguson C., Gale J., Gray E., Hingorani M., Hoskin P.J., Lester J.F., Malik Z.I., McKinna F., McPhail N., Money-Kyrle J., O'Sullivan J., Parikh O., Protheroe A., Robinson A., Srihari N.N., Thomas C., Wagstaff J., Wylie J., Zarkar

A., Parmar M.K.B., Sydes M.R.; STAMPEDE Investigators. Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy // N. Engl. J. Med. $-2017. - V. 377. - N_{2} 4. - P. 338-351.$

79. Deb S., Chin M.Y., Adomat H., Guns E.S. Abiraterone inhibits 1α ,25dihydroxyvitamin D₃ metabolism by CYP3A4 in human liver and intestine in vitro // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2014. – V. 144. – Nº Pt A. – P. 50-58.

80. Deeb K.K., Trump D.L., Johnson C.S. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics // Nat. Rev. Cancer. $-2007. - V. 7. - N_{2} 9. - P. 684-700.$

81. Attard G., Reid A.H., Yap T.A., Raynaud F., Dowsett M., Settatree S., Barrett M., Parker C., Martins V., Folkerd E., Clark J., Cooper C.S., Kaye S.B., Dearnaley D., Lee G., de Bono J.S. Phase I clinical trial of a selective inhibitor of CYP17, abiraterone acetate, confirms that castration-resistant prostate cancer commonly remains hormone driven // J. Clin. Oncol. – 2008. – V. 26. – № 28. – P. 4563-4571.
82. Del Re M., Fogli S., Derosa L., Massari F., De Souza P., Crucitta S., Bracarda S., Santini D., Danesi R. The role of drug-drug interactions in prostate cancer treatment: Focus on abiraterone acetate/prednisone and enzalutamide // Cancer Treat. Rev. – 2017. – V. 55. – P. 71-82.

83. Geboers S., Stappaerts J., Mols R., Snoeys J., Tack J., Annaert P., Augustijns
P. The Effect of Food on the Intraluminal Behavior of Abiraterone Acetate in Man
// J. Pharm. Sci. – 2016. – V. 105. – № 9. – P. 2974-2981.

84. Benoist G.E., Hendriks R.J., Mulders P.F., Gerritsen W.R., Somford D.M., Schalken J.A., van Oort I.M., Burger D.M., van Erp N.P. Pharmacokinetic Aspects of the Two Novel Oral Drugs Used for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Abiraterone Acetate and Enzalutamide // Clin. Pharmacokinet. – 2016. – V. $55. - N_{2} 11. - P. 1369-1380.$

85. Monbaliu J., Gonzalez M., Bernard A., Jiao J., Sensenhauser C., Snoeys J., Stieltjes H., Wynant I., Smit J.W., Chien C. In Vitro and In Vivo Drug-Drug Interaction Studies to Assess the Effect of Abiraterone Acetate, Abiraterone, and

Metabolites of Abiraterone on CYP2C8 Activity // Drug Metab. Dispos. – 2016. – V. 44. – № 10. – P. 1682-1691.

86. Vasaitis T., Belosay A., Schayowitz A., Khandelwal A., Chopra P., Gediya L.K., Guo Z., Fang H.B., Njar V.C., Brodie A.M. Androgen receptor inactivation contributes to antitumor efficacy of $17{alpha}-hydroxylase/17,20-lyase inhibitor 3beta-hydroxy-17-(1H-benzimidazole-1-yl)androsta-5,16-diene in prostate cancer // Mol. Cancer Ther. - 2008. - V. 7. - No 8. - P. 2348-2357.$

87. Taplin M.E., Antonarakis E.S., Ferrante K.J., Horgan K., Blumenstein B., Saad F., Luo J., de Bono J.S. Androgen Receptor Modulation Optimized for Response-Splice Variant: A Phase 3, Randomized Trial of Galeterone Versus Enzalutamide in Androgen Receptor Splice Variant-7-expressing Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer // Eur. Urol. – 2019. – V. 76. – \mathbb{N} 6. – P. 843-851.

88. Jorda R., Řezníčková E., Kiełczewska U., Maj J., Morzycki J.W., Siergiejczyk L., Bazgier V., Berka K., Rárová L., Wojtkielewicz A. Synthesis of novel galeterone derivatives and evaluation of their in vitro activity against prostate cancer cell lines // Eur. J. Med. Chem. – 2019. – V. 179. – P. 483-492.

89. Kwegyir-Afful A.K., Ramalingam S., Ramamurthy V.P., Purushottamachar P., Murigi F.N., Vasaitis T.S., Huang W., Kane M.A., Zhang Y., Ambulos N., Tiwari S., Srivastava P., Nnane I.P., Hussain A., Qiu Y., Weber D.J., Njar V.C.O. Galeterone and The Next Generation Galeterone Analogs, VNPP414 and VNPP433-3 β Exert Potent Therapeutic Effects in Castration-/Drug-Resistant Prostate Cancer Preclinical Models In Vitro and In Vivo // Cancers (Basel). – 2019. – V. 11. – Nº 11. – P. 1637.

90. Kwegyir-Afful A.K., Ramalingam S., Purushottamachar P., Ramamurthy V.P., Njar V.C. Galeterone and VNPT55 induce proteasomal degradation of AR/AR-V7, induce significant apoptosis via cytochrome c release and suppress growth of castration resistant prostate cancer xenografts in vivo // Oncotarget. – 2015. - V. 6. - N 29. - P. 27440-27460.

91. Dransfield D.T., Namdev N., Jacoby D.B., Ferrante K. Abstract 1234: Galeterone-induced degradation of the androgen receptor involves inhibition of deubiquitinating enzymes // Cancer Research. $-2016. - V. 76. - N_{2}$ 14 Supplement. -P. 1234.

92. Pelton K., Freeman M.R., Solomon K.R. Cholesterol and prostate cancer // Curr. Opin. Pharmacol. – 2012. – V. 12. – № 6. – P. 751-759.

93. Jiang S., Wang X., Song D., Liu X., Gu Y., Xu Z., Wang X., Zhang X., Ye Q., Tong Z., Yan B., Yu J., Chen Y., Sun M., Wang Y., Gao S. Cholesterol Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Prostate Cancer Cells by Suppressing Degradation of EGFR through APMAP // Cancer Res. $-2019. - V. 79. - N_{2} 12. - P.$ 3063-3075.

94. Hryniewicz-Jankowska A., Augoff K., Sikorski A.F. The role of cholesterol and cholesterol-driven membrane raft domains in prostate cancer // Exp. Biol. Med. (Maywood). $-2019. - V. 244. - N_{2} 13. - P. 1053-1061.$

95. Hu M.C., Hsu H.J., Guo I.C., Chung B.C. Function of Cyp11a1 in animal models // Mol. Cell Endocrinol. – 2004. – V. 215. – № 1-2. – P. 95-100.

96. Oksala R., Karimaa M., Simola O., Ramela M., Riikonen R., Vehmaan-Kreula P., Rummakko P., Wohlfahrt G., Kallio P., Mustonen M.V.J. CYP11A1 inhibition as a therapeutic approach for the treatment of castration resistant prostate cancer // Journal of Clinical Oncology. $-2018. - V. 36. - N_{\odot} 6$ suppl. - P. 340.

97. Friedlander, T.W., Ryan, C.J. Adrenal Androgen Synthesis Inhibitor Therapies in Castration-Resistant Prostate Cancer. // Drug Management of Prostate Cancer / edited by W. Figg, C. Chau, E. Small – Springer, New York, NY, 2010. – Ch. 8. – P. 91-100.

98. Martinez-Arguelles, D.B., Papadopoulos, V. Adrenal Steroidogenesis // Encyclopedia of Endocrine Diseases / edited by I. Huhtaniemi – 2nd edition. – Academic Press, London, UK, 2019. – V. 3, Ch. 7. – P. 56-63.

99. Santen R.J., Petroni G.R., Fisch M.J., Myers C.E., Theodorescu D., Cohen R.B. Use of the aromatase inhibitor anastrozole in the treatment of patients with advanced prostate carcinoma // Cancer. $-2001. - V.92. - N_{\odot} 8. - P. 2095-2101.$

100. Smith M.R., Kaufman D., George D., Oh W.K., Kazanis M., Manola J., Kantoff P.W. Selective aromatase inhibition for patients with androgen-independent prostate carcinoma // Cancer. $-2002. - V.95. - N_{2}9. - P. 1864-1868.$

101. Joulia M.L., Carton E., Jouinot A., Allard M., Huillard O., Khoudour N., Peyromaure M., Zerbib M., Schoemann A.T., Vidal M., Goldwasser F., Alexandre J., Blanchet B. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Relationship of Enzalutamide and Its Active Metabolite N-Desmethyl Enzalutamide in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Patients // Clin. Genitourin. Cancer. – 2020. – V. 18. – N_{2} 2. – P. 155-160.

102. Huang Z., Roy P., Waxman D.J. Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide // Biochem. Pharmacol. $-2000. - V. 59. - N_{\odot} 8. - P. 961-972.$

103. Kaluzhskiy L.A., Gnedenko O.V., Gilep A.A., Strushkevich N.V., Shkel T.V., Chernovetsky M.A., Ivanov A.S., Lisitsa A.V., Usanov A.S., Stonik V.A., Archakov A.I. Screening of human cytochrome P450(51) (CYP51A1) inhibitors: structural lanosterol analogues of plant and animal origin // Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. B Biomed. Chem. – 2014. – V. 8. – N_{2} 4. – P. 349-360.

104. Davydov R., Strushkevich N., Smil D., Yantsevich A., Gilep A., Usanov S., Hoffman B.M. Evidence that compound I Is the active species in both the hydroxylase and lyase steps by which P450scc converts cholesterol to pregnenolone: EPR/ENDOR/cryoreduction/annealing studies // Biochemistry. – 2015. – V. 54. – $N_{\rm P}$ 48. – P. 7089-7097.

105. Yablokov E.O., Sushko T.A., Ershov P.V., Florinskaya A.V., Gnedenko O.V., Shkel T.V., Grabovec I.P., Strushkevich N.V., Kaluzhskiy L.A., Usanov S.A., Gilep A.A., Ivanov A.S. A large-scale comparative analysis of affinity, thermodynamics and functional characteristics of interactions of twelve cytochrome P450 isoforms and their redox partners // Biochimie. -2019. - V. 162. - P. 156-166.

106. Gilep A.A., Guryev O.L., Usanov S.A., Estabrook R.W. Apo-cytochrome b5 as an indicator of changes in heme accessability: preliminary studies with cytochrome P450 3A4 // J. Inorg. Biochem. -2001. - V. 87. - P. 237-244.

107. Luthra A., Denisov I.G., Sligar S.G. Spectroscopic features of cytochrome
P450 reaction intermediates // Arch. Biochem. Biophys. – 2011. – V. 507. – № 1. –
P. 26-35.

108. Isin E.M., Guengerich F.P. Kinetics and thermodynamics of ligand binding by cytochrome P450 3A4 // J. Biol. Chem. – 2006. – V. 281. – № 14. – P. 9127-9136.

109. Shimada T., Kim D., Murayama N., Tanaka K., Takenaka S., Nagy L.D., Folkman L.M., Foroozesh M.K., Komori M., Yamazaki H., Guengerich F.P. Binding of diverse environmental chemicals with human cytochromes P450 2A13, 2A6, and 1B1 and enzyme inhibition // Chem. Res. Toxicol. – 2013. – V. 26. – N_{2} 4. – P. 517-528.

110. Isin E.M., Guengerich F.P. Multiple sequential steps involved in the binding of inhibitors to cytochrome P450 3A4 // J. Biol. Chem. $-2007. - V. 282. - N_{2} 9. - P. 6863-6874.$

111. Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants // Biochem. J. – 1953. – V. 55. – N_{2} 1. – P. 170-171.

112. Schneider E., Clark D.S. Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors // Biosens. Bioelectron. $-2013. - V. 39. - N_{2} 1. - P. 1-13.$

113. Kuzikov A.V., Dugin N.O., Stulov S.V., Shcherbinin D.S., Zharkova M.S., Tkachev Y.V., Timofeev V.P., Veselovsky A.V., Shumyantseva V.V., Misharin A.Y. Novel oxazolinyl derivatives of pregna-5,17(20)-diene as 17α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17A1) inhibitors // Steroids. – 2014. – V. 88. – P. 66-71.

114. Шумянцева В.В., Булко Т.В., Арчаков А.И. Электрохимическое восстановление цитохромов Р450 – путь к созданию биосенсоров и биореакторов // Биомедицинская химия. – 2004. – Т. 50. – № 3. – С. 243-259.

115. Шумянцева В.В., Булко Т.В., Мишарин А.Ю., Арчаков А.А. Поиск потенциальных ингибиторов цитохрома P450 17a1 (СУР17a1)

электрохимическими методами // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – № 4. – С. 402-409.

116. Murray, R.W. Chemically Modified Electrodes // Electroanalytical Chemistry
/ edited by A.J. Bard. – Marcel Dekker, Inc., New York, 1984. – V. 13. – P. 191-368.

117. Rusling, J.F., Wang, B., Yun, S. Electrochemistry of redox enzymes // Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications / edited by P.N. Bartlett. – John Wiley & Sons, Ltd, 2008. – Ch. 2. – P. 39-86.

118. Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems // J. Electroanal. Chem. – 1979. – V. 101. – P. 19-28.

119. 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 P450 51A1 (CYP51A1) человека // Биомедицинская химия. – 2013. – Т. 59. – № 4. – С. 388-398.

120. Sohl C.D., Guengerich F.P. Kinetic analysis of the three-step steroid aromatase reaction of human cytochrome P450 19A1 // J. Biol. Chem. -2010. - V.285. $- N_{2} 23. - P. 17734-17743.$

121. Kellis J.T. Jr., Vickery L.E. Purification and characterization of human placental aromatase cytochrome P-450 // J. Biol. Chem. – 1987. – V. 262. – № 9. – P. 4413-4420.

122. Raven G., de Jong F.H., Kaufman J.M., de Ronde W. In men, peripheral estradiol levels directly reflect the action of estrogens at the hypothalamo-pituitary level to inhibit gonadotropin secretion // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2006. – V. 91. – N_{2} 9. – P. 3324-3328.

123. T'Sjoen G.G., Giagulli V.A., Delva H., Crabbe P., De Bacquer D., Kaufman J.M. Comparative assessment in young and elderly men of the gonadotropin response to aromatase inhibition // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2005. – V. 90. – № 10. – P. 5717-5722.

124. Freedland S.J., Eastham J., Shore N. Androgen deprivation therapy and estrogen deficiency induced adverse effects in the treatment of prostate cancer // Prostate Cancer Prostatic Dis. $-2009. - V. 12. - N_{\odot} 4. - P. 333-338.$

125. Hammes S.R., Levin E.R. Impact of estrogens in males and androgens in females // J. Clin. Invest. – 2019. – V. 129. – № 5. – P. 1818-1826.

126. Nozaki O., Ohata T., Ohba Y., Moriyama H., Kato Y. Determination of urinary free cortisol by high performance liquid chromatography with sulphuric acid-ethanol derivatization and column switching // Biomed. Chromatogr. – 1992. – V. 6. – N_{2} 3. – P. 109-114.

127. Barrett Y.C., Akinsanya B., Chang S.Y., Vesterqvist O. Automated on-line SPE LC-MS/MS method to quantitate 6beta-hydroxycortisol and cortisol in human urine: use of the 6beta-hydroxycortisol to cortisol ratio as an indicator of CYP3A4 activity // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2005. – V. 821. – N 2. – P. 159-165.

128. Peng C.C., Templeton I., Thummel K.E., Davis C., Kunze K.L., Isoherranen N. Evaluation of 6 β -hydroxycortisol, 6 β -hydroxycortisone, and a combination of the two as endogenous probes for inhibition of CYP3A4 in vivo // Clin. Pharmacol. Ther. – 2011. – V. 89. – Nº 6. – P. 888-895.

129. Greenblatt D.J., Zhao Y., Venkatakrishnan K., Duan S.X., Harmatz J.S., Parent S.J., Court M.H., von Moltke L.L. Mechanism of cytochrome P450-3A inhibition by ketoconazole // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2011. – V. 63. – P. 214-221.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность за помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы научному руководителю, профессору кафедры биохимии МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, заведующей лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ, д.б.н., профессору Шумянцевой Виктории Васильевне и доценту кафедры биохимии МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, старшему научному сотруднику лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ, к.б.н., доценту Кузикову Алексею Владимировичу. Автор благодарит всех сотрудников кафедры биохимии МБФ и лаборатории биоэлектрохимии.

Автор выражает искреннюю благодарность начальнику лаборатории феромонов АО «Щёлково Агрохим» к.х.н. Стулову Сергею Владимировичу за помощь в проведении органического синтеза.

Автор выражает глубокую благодарность заведующему лаборатории структурной биоинформатики отдела биоинформатики ИБМХ, д.б.н. Веселовскому Александру Владимировичу, младшему научному сотруднику лаборатории структурной биоинформатики отдела биоинформатики ИБМХ Щербакову Кириллу Андреевичу и старшему научному сотруднику лаборатории структурно-функционального конструирования лекарств ИБМХ Дмитриеву Александру Викторовичу за проведение биоинформационных исследований.

Автор выражает искреннюю благодарность за проведение массспектрометрического анализа младшему научному сотруднику лаборатории системной биологии ИБМХ к.б.н. Завьяловой Марии Геннадьевне и старшему научному сотруднику группы масс-спектрометрии ЦКП «Протеом человека» к.б.н. Торопыгину Илье Юрьевичу.