Биомедицинская химия, 2014 том 60, вып. 5, с. 528-537.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.152.3
©Коллектив авторов

ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ЦИТОХРОМА P450(51) ЧЕЛОВЕКА (CYP51A1): СТРУКТУРНЫЕ АНАЛОГИ ЛАНОСТЕРОЛА РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Л.А. Калужский[1]*, О.В. Гнеденко[1], А.А. Гилеп[2], Н.В. Струшкевич[2], Т.В. Шкель[2], М.А. Черновецкий[3], А.С. Иванов[1], А.В. Лисица[1], С.А. Усанов[2], В.А. Стоник[4], А.И. Арчаков[1]

[1]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8; факс: +7 (499) 245-08-57; эл. почта: la-kaluzhskiy@yandex.ru
[2]Институт биоорганической химии Национальной академии наук республики Беларусь, Республика Беларусь, Минск
[3]Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии", Республика Беларусь, Минский р-н, Боровлянский с/с, д. Боровляны
[4]Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова ДВО РАН, Россия, Владивосток

Ингибирование пост-скваленовых этапов биосинтеза холестерина представляет собой альтернативу классической статиновой терапии. В качестве одной из возможных молекулярных мишеней рассматривается стероид 14α-деметилаза (CYP51). В представленной работе комбинацией методов поверхностного плазмонного резонанса и спектрального титрования был осуществлен скрининг потенциальных лигандов CYP51 человека с использованием серии природных соединений, содержащих стероид-подобный структурный элемент. Из проанализированной выборки 4 соединения (капсикозин, бетулафолиентриол, голотурин А, теасапонин) характеризовались высокой аффинностью к активному центру CYP51A1. Полученные данные расширяют спектр соединений, которые могут быть использованы в качестве специфических ингибиторов CYP51A1.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс, оптический биосенсор, спектральное титрование, цитохром P450, CYP51, тритерпены.

ВВЕДЕНИЕ

Фармакологический контроль эндогенного синтеза холестерина занимает важное место в лечении и профилактике развития атеросклероза. Для этого в настоящее время в клинической практике используются препараты из группы статинов [1], которые ингибируют активность гидроксиметилглутарил-CoA-редуктазы (HMGCR; КФ 1.1.1.34), то есть тормозят одну из ранних стадий эндогенного синтеза холестерина.

Негативный эффект использования статинов заключается в том, что ингибирование HMGCR останавливает синтез не только холестерина, но и других продуктов этого метаболического пути, что приводит к опасным побочным эффектам, в том числе печеночной недостаточности, скелетной миопатии и рабдомиолизу [2]. Поэтому актуальным остаётся создание препаратов, блокирующих эндогенный синтез холестерина на более поздних стадиях после образования фарнезилпирофосфата и не затрагивающих биосинтез изопреноидов [3]. Цитохром P450 51A1 (CYP51A1) принадлежит к семейству цитохромов P450 и представляет собой фермент, участвующий в биосинтезе мембранных стеролов (окислительное удаление 14α-метильной группы ланостерина [4]), в том числе холестерина у животных, эргостерола у грибов, и различных C24-модифицированных стеролов у растений и простейших (рис. 1).

* - адресат для переписки

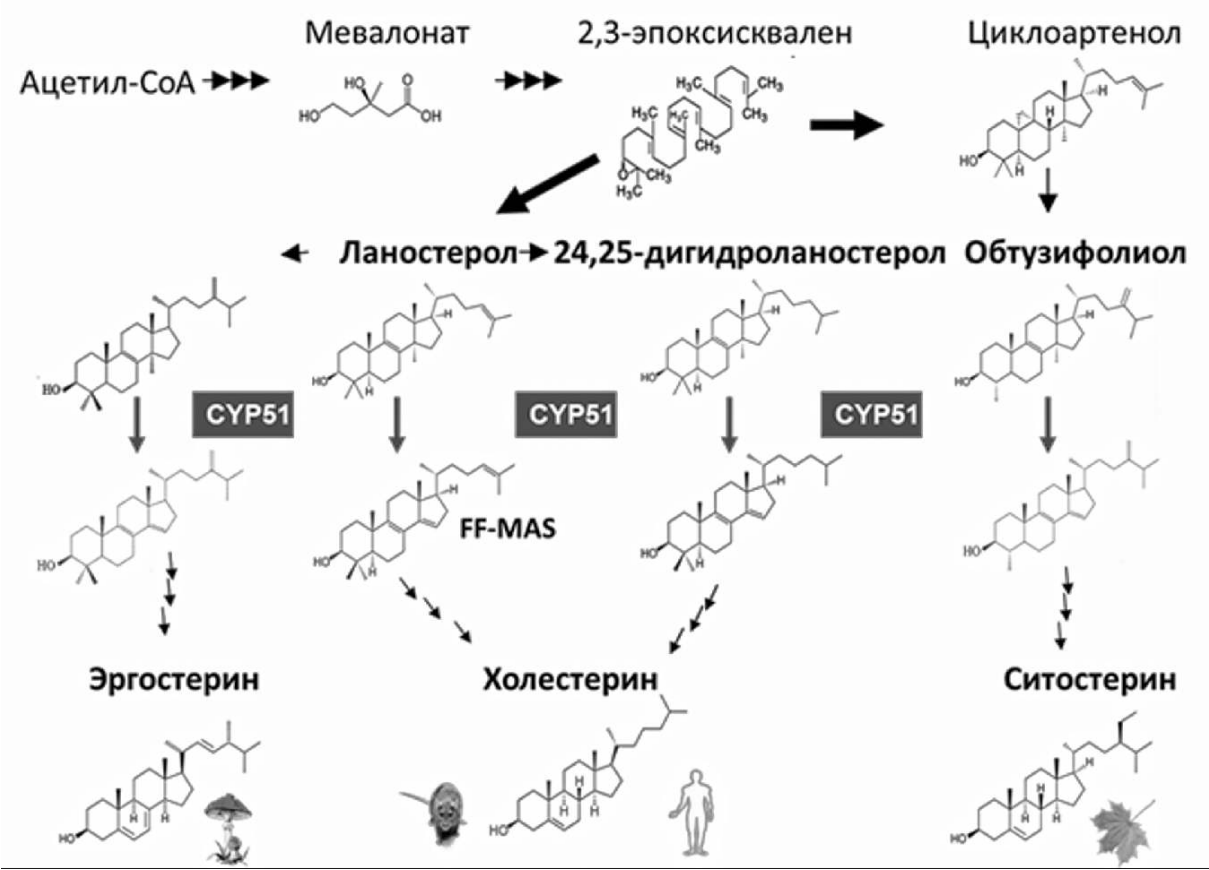


Рисунок 1. Схема биосинтеза стеролов с участием CYP51.

Данный фермент рассматривается как перспективная мишень для создания лекарств нового поколения, блокирующих эндогенный синтез холестерина. В настоящее время наиболее распространённым классом препаратов, ингибирующих активность ферментов семейства CYP51 являются азолы, использующиеся при терапии грибковых заболеваний. Однако этот класс препаратов обладает широким спектром действия на цитохромы P450, что приводит к ингибированию активности цитохромов, отвечающих за биосинтез желчных кислот, и других ферментов [5]. Кроме того, по мнению ряда авторов, азолы опасно применять во время протекания беременности [6, 7]. Ранее уже предпринимались попытки создать ингибиторы цитохромов семейства CYP51 на основе аналогов их субстратов, как возможную замену азолов и других применяемых для снижения уровня холестерина соединений, что позволило бы получить препараты, не обладающие токсическими эффектами этих медикаментов [8-13].

В настоящий момент известны 3 кристаллические структуры CYP51A1: белок без лигандов (PDB код 3JUV) и два комплекса с азольными ингибиторами – кетоконазолом (PDB код 3I3K) и эконазолом (PDB код 3JUS) [14]. Кроме этого, в 2014 году получена кристаллическая структура полноразмерной формы CYP51 дрожжевого гриба *Saccharomyces cerevisiae,* аминокислотная последовательность которого обладает достаточно высокой степенью гомологии с CYP51 патогенных грибов (62% в отношении CYP51 *Candida albicans,* 82% – CYP51 *C. glabrata,* 60% – CYP51 *C. guilliermondii*). Эти структурные данные могут быть использованы для компьютерного поиска и конструирования новых потенциальных ингибиторов CYP51A1 методами виртуального скрининга химических баз данных и 3D моделирования комплексов белок-лиганд [16].

Ранее, нами была разработана тест-система для скрининга лигандов CYP51A1 на базе биосенсора “Biacore”, работающего на технологии поверхностного плазмонного резонанса [17]. Целью данной работы был поиск перспективных соединений-прототипов, структурные мотивы которых могут в дальнейшем быть использованы для создания новых ингибиторов цитохромов семейства CYP51, не обладающих побочным эффектами существующих на данный

момент препаратов. В качестве модельного фермента для скрининга лигандов CYP51 в данном исследовании был использован высокоочищенный препарат CYP51A1 человека.

МЕТОДИКА

Материалы

В работе использовали следующие реактивы: гуанидинтиоционат, Трис(гидроксиметил)-аминометан (Трис), и этилен-диамино-тетраацетат натрия (Na-ЭДТА) фенилметил-сульфонилфторид (ФМСФ), кумасси бриллиантовый голубой R-250 (“Sigma”, США); агароза, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), дитиотреитол (“GibcoBRL”, США); Ni-NTA-Agarose (“Qiagen”, США); Bacto-Tryptone, Bacto-Peptone и Bacto-Yeast экстракт (“DifcoLaboratories”, США); Bio-Gel HTP (“Bio-Rad”, США), 3-[(3-холамидопропил)-диметиламмонио]-1-пропансульфонат (CHAPS) (“Sigma”, США), диметилсульфоксид (ДМСО) (“Sigma”, США), концентрат HBS-N буфера (100 мМ HEPES, pH 7,4 (при 10-ти кратном разведении), 1500 мМ NaCl) (“GE Healthcare”, США), этанол 99,5% (“Wako”, Япония), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-HCl (EDC) и N-гидроксисукцинимида (NHS) (“GE Healthcare”, США), 10 мМ ацетатный буфере (pH 5,0) (“GE Healthcare”, США), 1 М раствор этаноламин-HCl (pH 8,5) (“GE Healthcare”, США). В биосенсорных экспериментах использовали стандартные оптические чипы CM5 (“GE Healthcare”, США).

Экспрессия и очистка белка

Для работы был использован высокоочищенный (не менее 95% чистоты по ДСН-электрофорезу в 12% ПААГ) рекомбинантный CYP51A1 человека. Белок экспрессировали в клетках *E. coli* штамма DH5α, трансформированных плазмидной ДНК pCWori+CYP51A1. Клетки подвергали разрушению с использованием гомогенизатора Emulsifex C5 (“Avestine”, Канада), после чего белок солюбилизировали из мембран детергентом (CHAPS). Нерастворимый материал удаляли центрифугированием (при 35000 g в течение 60 мин). Фермент, содержащийся в супернатанте, очищали до гомогенного состояния с применением металло-аффинной хроматографии (сорбент Ni^{2+}-IDA сефароза 6B). Присутствующий в препарате имидазол удаляли с помощью адсорбционной хроматографии (сорбент – гидроксиапатит).

Спектрофотометрическое титрование

Спектрофотометрическое титрование CYP51A1 проводилось на спектрофотометре Shimadzu UV-3000. Раствор белка в конечной концентрации 1 мкМ в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4 помещали в две кюветы (l=1см). В опытную кювету добавляли раствор низкомолекулярного соединения в этаноле, в контрольную кювету добавляли равный объём растворителя. Разностный спектр поглощения белка регистрировали в области 350–500 нм через 5 мин после добавления лиганда. Контроль нативной P450 конформации белка в конце титрования осуществляли, записывая спектр поглощения CO-разностного спектра восстановленной формы белка в диапазоне 400-500 нм. При проведении эксперимента объемная концентрация этанола в кювете не превышала 3%.

Определение константы связывания субстрат-лиганд

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

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

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

Низкомолекулярные соединения

В работе были использованы различные стероидные и терпеновые соединения растительного и животного происхождения (табл. 1). Ланостерол был получен от фирмы “Sigma” (США). Соединения №№ 2-20 были любезно предоставлены профессором Kintya P. (The Institute of Genetics and Plant Physiology of the Academy of Sciences of Moldova). Соединения 21-39 были взяты из лабораторных коллекций низкомолекулярных соединений.

Таблица 1. Соединения, использованные в работе.
CID - PubChem ID (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/); HMDB - The Human Metabolome Database ID (http://www.hmdb.ca/); ND - нет данных.

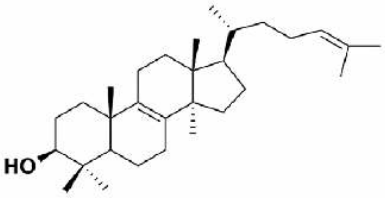
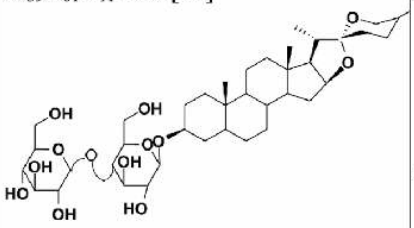
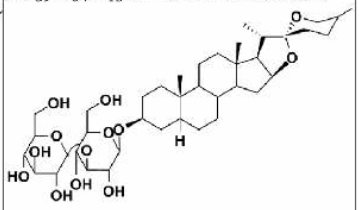
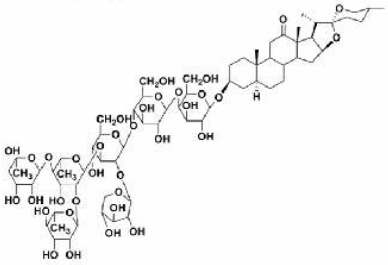
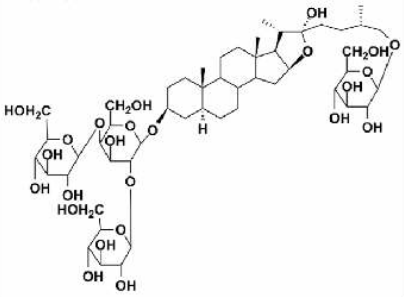
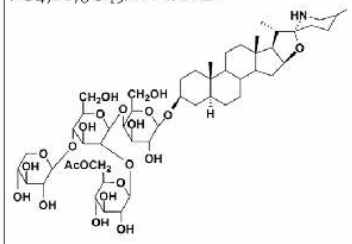
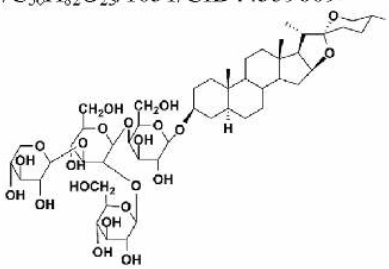
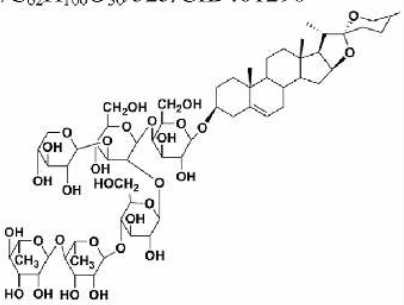
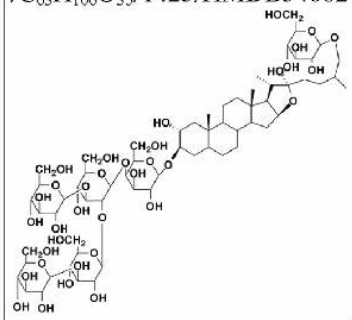
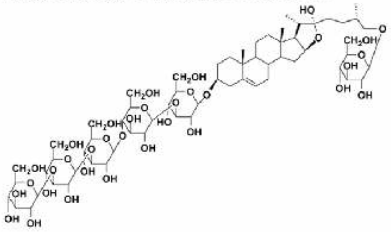
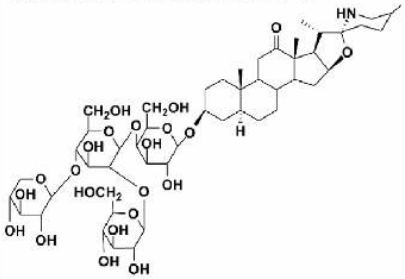
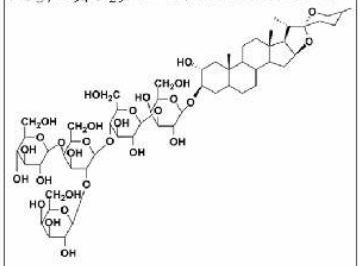
№ соединения; название /формула/мол. вес, Da/формула/ссылка		
№1 Ланостерол /$C_{30}H_{50}O$/427/CID246983 	№2 Неотигогенина биозид /$C_{39}H_{61}O_{11}$/705/[18] 	№3 Аспарогозид С /$C_{39}H_{64}O_{13}$/741/HMDB31835 
№4 Агавозид F /$C_{68}H_{110}O_{35}$/1488/HMDB32940 	№5 Томатозид А /$C_{51}H_{86}O_{24}$/1083/HMDB34083 	№6 Ацетат томатонина /$C_{47}H_{76}O_{19}$/944/ND 
№7 F-гитонин /$C_{50}H_{82}O_{23}$/1051/CID44559009 	№8 Функиозид Н /$C_{62}H_{100}O_{30}$/325/CID401296 	№9 Капсикозид А /$C_{63}H_{106}O_{35}$/1423/HMDB34082 
№10 Протополигонатозид G /$C_{63}H_{104}O_{34}$/1405/CID3085249 	№11 Томатонин /$C_{45}H_{74}O_{18}$/903/HMDB33849 	№12 Капсикозин /$C_{57}H_{94}O_{29}$/1243/HMDB31354 

Таблица 1. Соединения, использованные в работе (продолжение).

№13 Функиозид F/ $C_{50}H_{80}O_{22}$/1033/CID3042757	№14 Сульфированный томатонин/ $C_{50}H_{82}NO_{24}S$/967/ND	№15 Агавасапонин C/ $C_{45}H_{72}O_{19}$/917/HMDB33353
№16 Агавасапонин E/ $C_{62}H_{100}O_{31}$/1341/HMDB33807	№17 Тигогенин/ $C_{27}H_{44}O_3$/417/CID99516	№18 Ацетат β-ситостерола /$C_{31}H_{52}O_2$/457/HMDB30151
№19 β-ситостерол /$C_{29}H_{50}O$/415/HMDB00852	№20 Гекогенин /$C_{27}H_{42}O_4$/431/[19]	№21 5α-холестан-3β,6β-диол /$C_{27}H_{48}O_2$/405/CID164678
№22 Бисглюкозид бетулина /$C_{42}H_{70}O_{12}$/766/[20]	№23 Глюкозид бетулина /$C_{36}H_{60}O_7$/604/[20]	№24 Мальтозид бетулина /$C_{42}H_{70}O_{12}$/766/[20]
№25 Хедерагенин /$C_{30}H_{48}O_4$/473/CID73299	№26 Голотурин A /$C_{54}H_{85}NaO_{27}S$/1221/CID23687226	№27 Дигитонин /$C_{56}H_{92}O_{29}$/1229/CID25444

Таблица 1. Соединения, использованные в работе (продолжение).

№28 Каулозид D /$C_{53}H_{86}O_{22}$/1075/CID71586956	№29 Бетулафолиентриол /$C_{30}H_{52}O_3$/461/CID3080633	№30 Стихопозид B/ $C_{43}H_{68}O_{14}$/809/[20]
№31 Мальтозид холестерина /$C_{39}H_{66}O_{11}$/710/[20]	№32 Глюкозид β-ситостерола /$C_{35}H_{60}O_6$/576/[20]	№33 Стихопозид A/ $C_{43}H_{68}O_{13}$/792/CID119095
№34 Теасапонин /$C_{59}H_{92}O_{27}$/1233/CID11953922	№35 Глюкозид холестерина /$C_{33}H_{56}O_6$/549/[20]	№36 Стихопозид C /$C_{68}H_{110}O_{32}$/1439/[20]
№37 Каулозид C /$C_{41}H_{66}O_{13}$/767/CID13878151	№38 Теленотозид B /$C_{55}H_{88}O_{23}$/1117/CAS №72175-95-2	№39 28-O-β-D-глюкопиранозид бетулина /$C_{36}H_{60}O_7$/604/ND

Поверхностный плазмонный резонанс

Для исследования межмолекулярных взаимодействий был использован оптический биосенсор Biacore 3000 (“GE Healthcare”, США). Сигнал биосенсора регистрировали в каждом канале биосенсора независимо в резонансных единицах (RU, 1 RU соответствует связыванию 1 пг белка/мм^2 поверхности оптического чипа) и представляли в виде сенсограмм, показывающих его изменение во времени. Все эксперименты были выполнены при 25°C с использованием стандартных оптических чипов CM5, покрытых слоем карбоксиметилированного декстрана.

Равновесные константы диссоциации (K_D) комплексов низкомолекулярных соединений с иммобилизованным CYP51A1 вычисляли в программе BIAevaluation v4.1 (“GE Healthcare”). Средняя величина и стандартная ошибка K_D получены из не менее чем трёх экспериментов.

Приготовление тестовых образцов низкомолекулярных соединений

Низкомолекулярные соединения (табл. 1, №2-39) растворяли в ДМСО до концентрации 3 мМ.

Для снижения оптических артефактов в ходе проведения биосенсорного эксперимента (bulk-effect) следовали нижеследующему протоколу. Тестируемые соединения (исходные растворы 3 мМ) разводили до концентрации 100 мкМ HBS-N буфером (pH 7,4, 150 мМ NaCl, 10 мМ HEPES). Тестовые концентрации образцов для анализа готовили из 100 мкМ аликвот с использованием HBS-N буфера с добавлением ДМСО, концентрация которого была нормализована по коэффициенту преломления среды с 100 мкМ образцами соединений с использованием рефрактометра RX-5000 (“ATAGO”, Япония). Образцы ланостерола готовили аналогичным образом, но вместо ДМСО использовали этанол. Все экспериментальные образцы ланостерола готовились непосредственно перед инжекцией в биосенсор.

Иммобилизация CYP51A1 на поверхности оптического чипа CM5

В качестве рабочего буфера использовали HBS-N буфер. Карбоксильные группы декстрана были активированы путём пропускания смеси равных объёмов 0,2 M EDC и 0,05 M NHS в течении 7 мин при скорости потока 5 мкл/мин с последующей промывкой буфером HBS-N при той же скорости в течении 1 мин. Далее осуществляли иммобилизацию CYP51A1 путём пропускания его раствора (20 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (pH 5,0) по каналам оптического чипа CM5 в течение 10 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Не прореагировавшие с белком активированные карбоксильные группы декстрана блокировали пропусканием 1 M раствора этаноламин-HCl (pH 8,5) в течение 1 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Эффективность иммобилизации составляла в среднем 15 нг CYP51A1 на канал.

В качестве сравнения использовали свободный канал биосенсора, в котором не проводилась иммобилизация белка.

Скрининг низкомолекулярных соединений на способность взаимодействовать с CYP51A1

В качестве рабочего буфера использовали HBS-N буфер, содержащий ДМСО, концентрация которого была нормализована по коэффициенту преломления среды с 100 мкМ образцами соединений. Скрининг осуществляли путём последовательного пропускания 30 мкМ растворов низкомолекулярных соединений через опытный (с иммобилизованным CYP51A1) и контрольный (без белка) каналы биосенсора в течение 6 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Поверхность оптического чипа регенерировали двукратной инжекцией регенерационного раствора (2 M NaCl, 0,4% (m/v) CHAPS) в течение 17 с при скорости потока 35 мкл/мин. Результаты скрининга оценивали по разности сигналов опытного и контрольного каналов биосенсора на последней минуте инжекции раствора низкомолекулярного соединения. Эксперимент повторяли не менее трёх раз.

Эксперимент проводился по аналогичной методике, но вместо ДМСО в рабочий буфер добавляли этанол.

Регистрация кинетических параметров взаимодействий низкомолекулярных соединений с CYP51A1

В качестве рабочего буфера использовали HBS-N буфер, содержащий ДМСО, концентрация которого была нормализована по коэффициенту преломления среды с 100 мкМ образцами соединений. Растворы низкомолекулярных соединений пропускали через контрольный и опытный каналы биосенсора в течении 360 с при скорости потока 10 мкл/мин в диапазоне концентраций 10-100 мкМ (соединения №№1-8, 10-39) и 1-10 мкМ (соединение №9). После окончания инжекции диссоциацию комплексов “CYP51A1-низкомолекулярное соединение” регистрировали в течении не менее чем 360 с. Поверхность оптического чипа регенерировали двукратной

инжекцией регенерационного раствора (2 M NaCl, 0,4% m/v CHAPS) в течение 17 с при скорости потока 35 мкл/мин. При работе с ланостеролом использовался вышеописанный протокол, но вместо ДМСО использовали 99% этанол.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований по связыванию различных лигандов с иммобилизованным CYP51A1 на поверхности оптического чипа было показано, что ряд соединений способен взаимодействовать с ферментом (рис. 2). Большинство использованных для скрининга веществ представляют собой конъюгированные соединения, содержащие стероидоподобный структурный элемент. При этом, в отличие от ланостерола (природного субстрата) данные вещества имеют значительно больший молекулярный вес и разветвленную структуру. Для соединений, показавших уровень сигнала, превышающий 15 RU (уровень отсечения был введён эмпирически для выбраковки наименее активно связывающихся с иммобилизованным белком соединений, поскольку низкий уровень связывания свидетельствует о более низкой скорости образования комплексов “иммобилизованный белок-низкомолекулярное соединение”), в экспериментах на оптическом биосенсоре были получены значения K_D комплексов “CYP51A1-низкомолекулярное соединение”. Таким образом, в выборке из 38 соединений методом поверхностного плазмонного резонанса было обнаружено 21 соединение, способное взаимодействовать с CYP51A1. При этом следует отметить, что аффинность большинства протестированных соединений к ферменту несколько ниже, чем природного субстрата ланостерола (табл. 2).

Однако данные биосенсора не являются показателем того, что низкомолекулярное соединение способно связываться с активным центром фермента и влиять на его функцию. Оптический биосенсор учитывает все типы контактов лигандов с поверхностью липофильного фермента. Для подтверждения способности этих соединений связываться с активным центром фермента и изменять спиновое состояние атома железа гема было проведено исследование методом спектрального титрования. Результаты биосенсорного исследования и спектрального титрования представлены в таблице 2. Методом спектрального титрования было показано, что 4 соединения из этой выборки: капсикозин, голотурин А, бетулафолиентриол и теасапонин (12, 26, 29, 34) – способны взаимодействовать с активным центром CYP51A1. Следует отметить, что полученные с помощью оптического

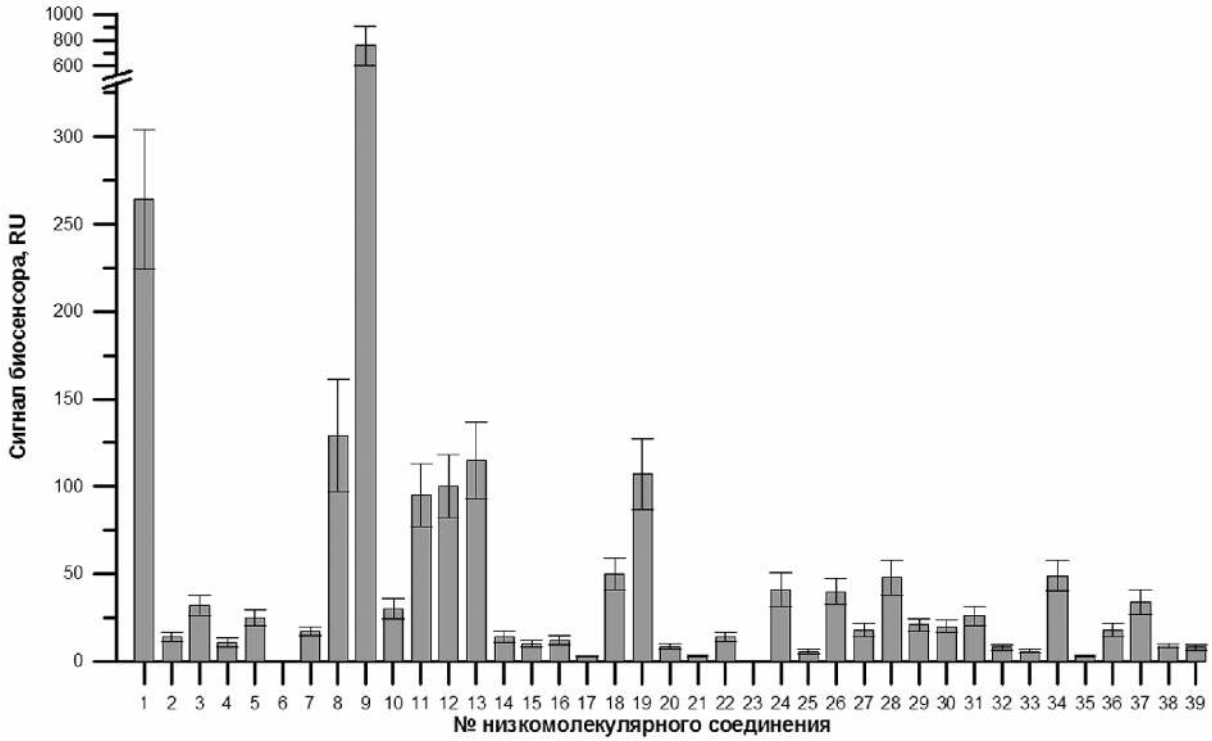


Рисунок 2. Результат скрининга низкомолекулярных соединений на способность взаимодействовать с CYP51A1 *in vitro*. Концентрация образцов – 30 мкМ.

Таблица 2. Константы диссоциации комплексов CYP51A1 с низкомолекулярными соединениями, полученные с помощью оптического биосенсора и спектрального титрования.

№ соединения	Соединение	K_D комплекса с CYP51A1, мкМ	
		Биосенсор	Спектральное титрование
1	Ланостерол	2,10 ± 0,32	5,75 ± 0,49*
3	Аспаракозид С	ND	ND
5	Томатозид	14,90 ± 2,38	ND
7	F-гитонин	62,00 ± 10,54	ND
8	Функиозид Н	24,10 ± 3,37	ND
9	Капсикозид А	6,67 ± 1,27	ND
10	Протополигонатозид G	ND	ND
11	Томатонин	ND	ND
12	Капсикозин	18,70 ± 3,37	2,42 ± 0,72
13	Функиозид F	0,27 ± 0,05	ND
18	Ацетат бета-ситостерина	118,00 ± 23,6	ND
19	Бета-ситостерин	3,56 ± 0,61	ND
24	Мальтозид бетулина	26,00 ± 3,64	ND
26	Голотурин А	19,50 ± 3,71	78,10 ± 11,70
27	Дигитонин	27,00 ± 4,59	ND
28	Каулозид D	5,30 ± 0,90	ND
29	Бетулафолиентриол	7,00 ± 1,26	3,04 ± 0,52
30	Стихопозид В	9,00 ± 1,35	ND
31	Мальтозид холестерина	7,70 ± 1,46	ND
34	Теасапонин	140,00 ± 25,20	21,96 ± 4,40
36	Стихопозид С	60,00 ± 13,80	ND
37	Каулозид С	18,00 ± 3,06	ND

Примечание: ND - зафиксировать значимые параметры взаимодействия не удалось. * - по данным предыдущих работ [14].

биосенсора значения K_D для комплексов низкомолекулярных соединений с CYP51A1 отличаются от значений K_D, полученных в ходе экспериментов по спектрофотометрическому титрованию. Данный результат может иметь несколько объяснений: 1) разная прочность комплексов, находящихся в растворе и на поверхности оптического чипа; 2) лиганды могут взаимодействовать с различными участками фермента.

Таким образом, в результате проведенных исследований был обнаружен ряд природных терпеновых соединений, являющихся структурными аналогами природного субстрата ланостерола, и способных взаимодействовать с активным центром CYP51A1. Полученные данные расширяют спектр соединений, которые могут быть использованы в качестве специфических ингибиторов CYP51A1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Проведена эффективная иммобилизация высокоочищенного ферментного препарата CYP51A1 человека на поверхности оптического биосенсора. С использованием сочетания методов поверхностного плазмонного резонанса и спектрального титрования был осуществлен скрининг лигандов CYP51A1 в ряду природных соединений (38 соединений, структурных аналогов ланостерола), полученных из уникальных источников (растений и морских беспозвоночных). Эффективное взаимодействие с активным центром было зарегистрировано для четырёх соединений: капсикозина, голотурина А, бетулафолиентриола и теасапонина.

Авторы выражают глубокую признательность профессору Kintya P. (The Institute of Genetics and Plant Physiology of the Academy of Sciences of Moldova) за предоставленные образцы низкомолекулярных соединений. Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта “14-04-31816 мол_а” РФФИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Taylor F., Ward K., Moore T.H., Burke M., Davey Smith G., Casas J.P., Ebrahim S.* (2011) Cochrane Database Syst Rev., **1**, CD004816. DOI: 10.1002/14651858.CD004816.pub4.
2. *Baker S.K.* (2005) Muscle Nerve, **31**, 572-580.
3. *Korošec T., Ačimovič J., Seliškar M., Kocjan D., Fon Tacer K., Rozman D., Urleb U.* (2008) Bioorg. Med. Chem., **16**, 209–221.
4. *Lamb D.C., Kelly D.E., Kelly S.L.* (1998) FEBS Lett., **425**, 263-265.
5. *Nagai K., Miyamori I., Takeda R., Suhara K., Katagiri M.* (1987) J. Steroid Biochem., **28**, 333-336.
6. *Kragie L., Turner S.D., Patten C.J., Crespi C.L., Stresser D.M.* (2002) Endocr. Res., **28**, 129-140.
7. *Giavini E., Menegola E.* (2010) Toxicol Lett., **198**, 106-111. DOI: 10.1016/j.toxlet.2010.07.005.
8. *Trzaskos J.M., Magolda R.L., Favata M.F., Fischer R.T., Johnson P.R., Chen H.W., Ko S.S., Leonard D.A., Gaylor J.L.* (1993) J. Biol. Chem., **268**, 22591-22599.
9. *Trzaskos J.M., Ko S.S., Magolda R.L., Favata M.F., Fischer R.T., Stam S.H., Johnson P.R., Gaylor J.L.* (1995) Biochemistry, **34**, 9670-9676.
10. *Cooper A.B., Wright J.J., Ganguly A.K., Desai J., Loebenberg D., Parmegiani R., Feingold D.S.* (1988) Ann. N.Y. Acad. Sci., **544**, 109-112.
11. *Frye L.L., Cusack K.P., Leonard D.A.* (1993) J. Med. Chem., **36**, 410-416.
12. *Frye L.L., Robinson C.H.* (1990) J. Org. Chem., **55**(5), 1579–1584.
13. *Bossard M.J., Tomaszek T.A.Jr., Gallagher T.F., Metcalf B.W., Adams J.L.* (1991) Bioorganic Chem., **19**, 418-432.
14. *Strushkevich N., Usanov S.A., Park H.-W.* (2010) J. Mol. Biol., **397**, 1067-1078.
15. *Monk B.C., Tomasiak T.M., Keniya M.V., Huschmann F.U., Tyndall J.D., O'Connell J.D., Cannon R.D., McDonald J.G., Rodriguez A., Finer-Moore J.S., Stroud R.M.* (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **111**, 3865-3870.
16. *Mukha D.V., Feranchuk S.I., Gilep A.A., Usanov S.A.* (2011) Biochemistry (Moscow), **76**, 175-185.
17. *Gnedenko O.V., Kaluzhskiy L.A., Molnar A.A., Yantsevich A.V., Mukha D.V., Gilep A.A., Usanov S.A., Stonik V.A., Ivanov A.S., Lisitsa A.V., Archakov A.I.* (2013) Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, **7**, 187-195.
18. *Pilipenko V.V., Sukhodub L.F., Aksyonov S.A., Kalinkevich A.N., Kintia P.K.* (2000) Rapid. Commun. Mass. Spectrom. **14**, 819-823.
19. *Димогло А.С., Чобан И.Н., Берсукер И.Б., Кинтя П.К., Балашова Н.Н.* (1985) Биоорг. химия, **11**, 408-413.
20. *Ershov P.V., Gnedenko O.V., Molnar A.A., Lisitsa A.V., Ivanov A.S., Archakov A.I.* (2009) Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, **3**, 272–288.

Поступила: 26. 06. 2014.

THE SCREENING OF THE INHIBITORS OF THE HUMAN CYTOCHROME P450(51) (CYP51A1): THE PLANT AND ANIMAL STRUCTURAL LANOSTEROL'S ANALOGS

L.A. Kaluzhskiy[1], O.V. Gnedenko[1], A.A. Gilep[2], N.V. Strushkevich[2], T.V. Shkel[2], M.A. Chernovetsky[3], A.S. Ivanov[1], A.V. Lisitsa[1], A.S. Usanov[2], V.A. Stonik[4], A.I. Archakov[1]

[1]Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of the Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121, Russia; fax: +7 (499) 245-08-57; e-mail: la-kaluzhskiy@yandex.ru
[2]Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[3]National Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus
[4]Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok, Russia

The cholesterol biosynthesis regulation is the important part of the hypercholesterolemia diseases therapy. The inhibition of the post-squalene cholesterol biosynthesis steps provide the alternative to classic statin therapy. Sterol-14α-demethylase (CYP51) is one of the hypothetical targets for it. In this work the screening of the ability to interact with human CYP51 (CYP51A1) for the nature low-weight compounds with steroid-like scaffold were performed by integration of the surface plasmon resonance biosensor and spectral titration methods. The results of the selection were 4 compounds (betulafolientriol, holothurin A, teasaponin, capsicoside A) witch had high affinity to the CYP51A1 active site. These data extend the range of compounds which may be used as specific inhibitors of CYP51 and give the permission to suggest the dynamic of the enzyme.

Key words: surface plasmon resonance, optical biosensor, spectral titration, cytochrome P450, CYP51, triterpenes.