

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

ХИМИЯ
CHEMISTRY

УДК 577.322.23

Поступило в редакцию 25.10.2017

Received 25.10.2017

**А. В. Свирид¹, М. А. Шапиро¹, П. Г. Шагойко², Ю. Г. Походня², А. А. Гилеп¹,
член-корреспондент С. А. Усанов¹**

¹*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

²*Национальная антидопинговая лаборатория, Минск, Республика Беларусь*

**ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
РЕКОМБИНАНТНОЙ ТРОМБОКСАНСИНТАЗЫ ЧЕЛОВЕКА**

Аннотация. С целью выявления модуляторов активности тромбоксансинтазы человека осуществлен анализ взаимодействия рекомбинантного гемопротейда с различными низкомолекулярными лигандами. Показано, что тромбоксансинтаза взаимодействует с рядом жирных кислот и их производных (потенциальные субстраты или конкурентные ингибиторы), а также является мишенью для ингибирования производными имидазола и триазола, применяющимися в медицинской практике и сельском хозяйстве, что позволило установить механизм, по которому могут реализовывать свое токсическое действие соединения, нарушающие работу эндокринной системы человека (endocrine-disrupting chemicals, EDC).

Впервые показано восстановление атома железа гема тромбоксансинтазы NADPH-цитохром P450 редуктазой, что оказывает частичное ингибирующее действие на фермент и подавляет образование побочных продуктов реакции – 12-гидроксигептадекатриеновой кислоты (12-ННТ) и малонового диальдегида (МДА). Предполагается, что данный механизм может участвовать в регуляции активности фермента *in vivo*.

Ключевые слова: тромбоксансинтаза человека (TXAS), разностное спектрофотометрическое титрование, NADPH-цитохром P450 редуктаза (CPR), азолы, жирные кислоты, endocrine-disrupting chemicals (EDC)

Для цитирования: Лиганд-связывающие и каталитические свойства рекомбинантной тромбоксансинтазы человека / А. В. Свирид [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 51–65.

**Andrey V. Svirid¹, Michail A. Shapira¹, Pavel G. Shahoika², Yury G. Pakhadnia², Andrei A. Gilep¹,
Corresponding Member Sergei A. Usanov¹**

¹*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

²*National Antidoping Laboratory, Minsk, Republic of Belarus*

**LIGAND-BINDING AND CATALYTIC PROPERTIES OF RECOMBINANT HUMAN
THROMBOXANE SYNTHASE**

Abstract. To study the spectrum of modulators of the human thromboxane synthase activity, the interaction of recombinant protein with various low-molecular weight ligands was analyzed. It was shown that thromboxane synthase interacts with a number of fatty acids and their derivatives (potential substrates or concurrent inhibitors), being a target for nonselective inhibition by imidazole and triazole derivatives used in medical practice and agriculture. Thus, another mechanism of action of endocrine-disrupting chemicals (EDC) was established.

For the first time, the reduction of heme iron of thromboxane synthase by cytochrome P450 reductase was shown. This interaction accompanied by a partial inhibitory effect on the enzyme suppresses the formation of reaction by-products 12-hydroxyheptadecatenic acid (12-HHT) and malonic dialdehyde (MDA). It is likely that this mechanism can participate in the regulation of the enzyme activity *in vivo*.

Keywords: human thromboxane synthase (TXAS), differential spectrophotometric titration, cytochrome P450 reductase (CPR), azoles, fatty acids, endocrine-disrupting chemicals (EDC)

For citation: Svirid A. V., Shapira M. A., Shahoika P. G., Pakhadnia Yu. G., Gilep A. A., Usanov S. A. Ligand-binding and catalytic properties of human recombinant thromboxane synthase. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 51–65 (in Russian).

Введение. Цитохромы P450 (CYP) – ферменты, играющие важнейшую роль в метаболизме множества эндогенных и экзогенных соединений. Цитохромы P450 участвуют в биосинтезе ряда биологически активных соединений из группы эйкозаноидов. Среди них следует отметить тромбоксаны и простаглицлины, последовательный синтез которых осуществляется циклооксигеназой (ЦОГ) и тромбоксан- и простаглицлин-синтазами (TXAS и PGIS, КФ 5.3.99.5 и КФ 5.3.99.4 соответственно), принадлежащими к суперсемейству цитохромов P450 [1].

Изомеризация простаглицдина H_2 (PGH₂) в тромбоксан A₂ (TXA₂), катализируемая тромбоксансинтазой, является ключевым этапом сложного многофакторного механизма агрегации тромбоцитов и сокращения стенок кровеносных сосудов, который способствует процессу тромбообразования.

Первоначально тромбоксансинтаза была выделена из тромбоцитов человека. Фермент преимущественно синтезируется в протромбоцитах и стволовых гематопозитических клетках-предшественниках моноцитов, лейкоцитов и макрофагов, где TXA₂ участвует в регуляции их дифференцировки [2]. Среди других типов клеток синтез TXAS обнаружен в клетках легких, почек, желудка, кишечника, селезенки, тимуса, поджелудочной железы и печени [3]. Однако об особенностях функционирования указанного фермента как в тромбоцитах и их предшественниках, так и в других типах клеток, где он экспрессируется, известно сравнительно мало: не известна пространственная структура белка, недостаточно информации о модуляторах активности фермента как низко-, так и высокомолекулярных. В связи с этим роль тромбоксансинтазы в клетках других тканей, кроме крови, и точный механизм развития и патогенеза болезней кроветворной системы до сих пор остаются невыясненными.

В отсутствие данных о трехмерной структуре ферментов, наиболее часто используемым методом для характеристики активного центра является анализ данных о лигандах, взаимодействующих с ним. Для понимания структурной организации цитохромов P450 используют скрининг потенциальных субстратов и ингибиторов. Анализ литературных данных свидетельствует о практически полном отсутствии сведений о влиянии известных ингибиторов цитохромов P450 на тромбоксансинтазу.

Для скрининга ингибиторов наиболее логичным является выбор тех соединений, которые взаимодействуют с различными цитохромами P450, при этом оптимальной стратегией будет использование соединений, встречающихся в повседневной жизни человека и, как следствие, способных оказывать влияние на тромбоксансинтазу. Наиболее известными соединениями такого рода являются азолы. Азольные соединения – ингибиторы цитохромов P450 грибов и ряда других патогенных организмов, действие которых направлено на нарушение синтеза эргостерина за счет ингибирования функции ланостерин 14 α -деметилазы (CYP51). К таким соединениям также относятся ингибитор стероид-17- α -гидроксилазы (CYP17A1) абиратерон и ингибиторы ароматазы (CYP19A1) анастрозол и летрозол. Кроме того, соединения этого ряда используют в качестве пестицидов (фунгицидов) в сельском хозяйстве и промышленности.

Взаимодействие азолов с цитохромами P450 реализуется за счет комплексного эффекта гидрофобных взаимодействий боковых групп азотсодержащих соединений и консервативных остатков активного сайта цитохрома P450, а также образования координационной связи азота азольной или триазольной группы и железа гема. Таким образом, параметры взаимодействия тромбоксансинтазы с азольными соединениями, широко встречающимися в промышленности и медицине, сами по себе являются важным фармакологическим показателем, что может пролить свет на механизм действия веществ, нарушающих работу эндокринной системы (endocrine-disrupting chemicals (EDC)).

На данный момент отсутствуют данные о каких-либо аллостерических эффекторах активности тромбоксансинтазы, а также о ее возможных белковых партнерах, ответственных как за регуляцию активности фермента, так и за перенос метастабильных продуктов реакции к мишеням действия данных соединений, относящихся к группе аутокринных и паракринных регуляторов (тромбоксана A₂ (TXA₂), 12-гидроксигептадекатриеновой кислоты (12-ННТ), рис. 1). Поиск таких белковых партнеров и их функциональных связей является актуальной задачей – модуляторы активности ферментов, равно как и транспортеры метастабильных по своей химической природе соединений представляют интерес для лекарственной терапии целого ряда заболеваний.

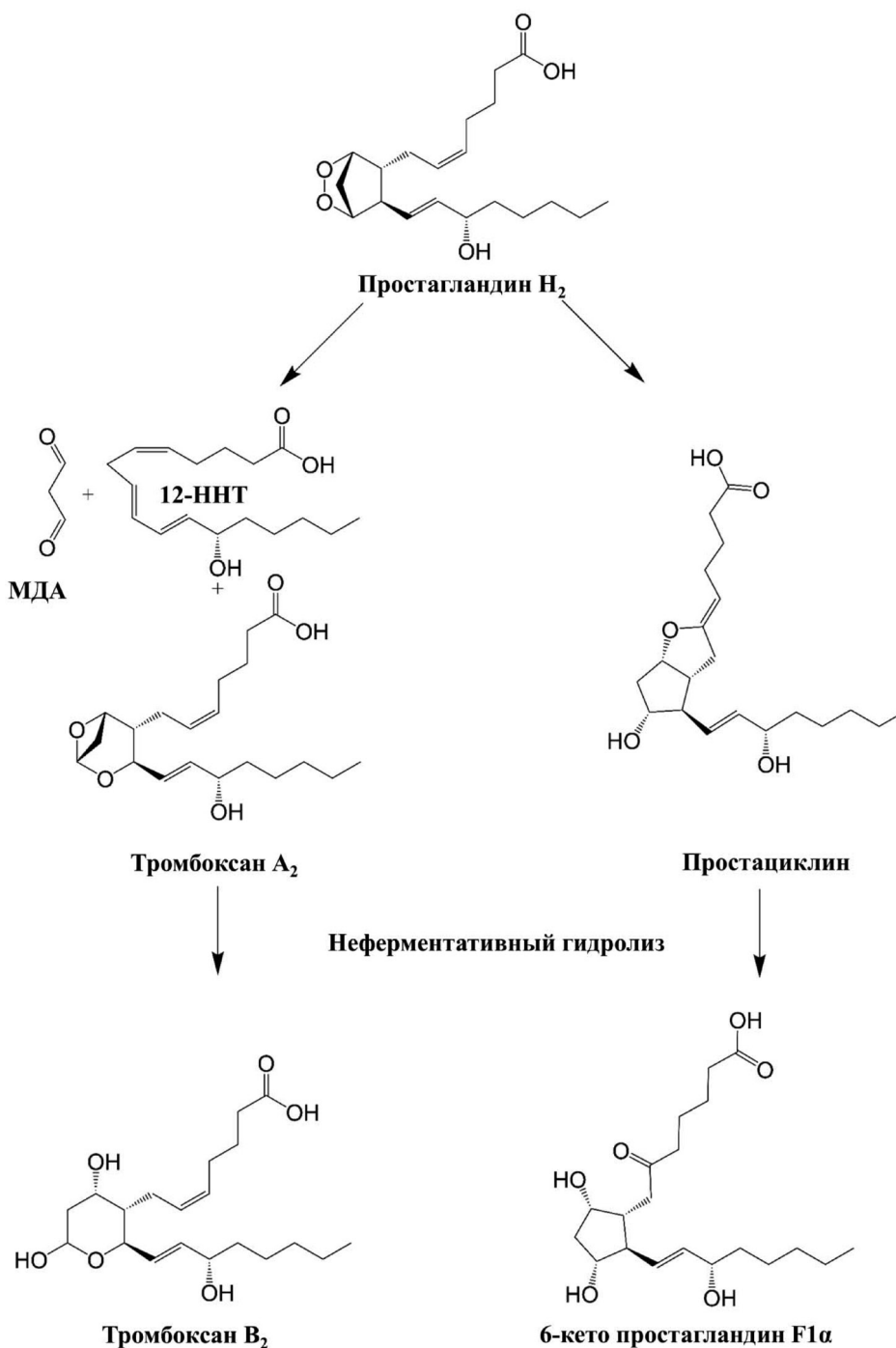


Рис. 1. Изомеризация простагландина H₂ в тромбоксан A₂ и простациклин

Fig. 1. Isomerization of prostaglandin H₂ to thromboxane A₂ and prostacyclin

Материалы и методы исследования. В работе использовались следующие реактивы: Tris основной, этилен-диамино-тетраацетат натрия (Na-ЭДТА) жирные кислоты и их производные, производные имидазола и триазола, NADPH, D-глюкоза (Sigma, США), C₁₈-картриджи для твердофазной экстракции Sep-Pak (Waters, США), простагландины и их производные (Cayman Chemical, Santa Cruz Biotechnology, США), ацетонитрил, метанол, муравьиная кислота (Fisher Chemical, США), 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновая кислота (HEPES), холат натрия (Serva, Германия), каталаза (Merck, Германия), глюкозооксидаза, изоцитратдегидрогеназа (Boehringer Ingelheim, Германия).

Рекомбинантную тромбосансинтазу человека экспрессировали и выделяли по описанной нами ранее методике [4].

Разностное спектрофотометрическое титрование. Титрование 1 мкМ раствора фермента проводили в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4). Разностный спектр поглощения регистрировали в области 350–500 нм. Для титрования использовали растворы лигандов в этаноле с исходной концентрацией 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} М. Состояние белка в начале и в конце титрования контролировалось записью абсолютного спектра поглощения фермента в том же диапазоне длин волн. Во время эксперимента объемная концентрация этанола в кювете не превышала 1 %. Титрование проводили на двухлучевом спектрофотометре Cary 5000 (Agilent Technologies, США).

Определение константы диссоциации комплекса фермента с лигандом. Константу диссоциации комплекса фермент-лиганд (K_d) определяли, аппроксимируя данные спектрофотометрического титрования нелинейной функцией [5]:

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

где A – амплитуда спектрального ответа при концентрации лиганда $[L]$; A_{\max} – амплитуда спектрального ответа при насыщении фермента лигандом; $[L]$ – текущая концентрация лиганда в растворе; $[E]$ – концентрация фермента.

Определение изомеразной активности фермента. Активность фермента реконструировали в аликвотах (1500 мкл), содержащих смесь фермента в концентрации 7 пкмоль/мл и 60 нмоль/мл субстрата. Реакция проводилась в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4). Кинетический спектр поглощения для регистрации побочных продуктов реакции записывался в области 300–200 нм при 20 °С от 0 до 10 мин. Интервал записи спектра – 0,2 мин. Реакция останавливалась по прошествии 10 мин добавлением метанола до конечной концентрации 50 %. Продукт реакции экстрагировали из реакционной смеси на C_{18} -картриджах для твердофазной экстракции Sep-Pak (Waters, США) по инструкции производителя.

Количество основного продукта реакции анализировали на ВЭЖХ системе, оснащенной колонкой BDS Hypersil C18 ($2,1 \times 150$ мм, размер частиц 3 мкм) (Thermo Fisher Scientific, США), с проточным оптическим и масс-спектрометрическим детектором TSQ Quantum Access (Thermo Fisher Scientific, США). Состав подвижной фазы был следующим: градиент растворителя Б (0,1 %-ная муравьиная кислота в ацетонитриле) в растворителе А (0,2 %-ная муравьиная кислота). Программа разделения заключалась в градиенте растворителя Б (от 5 % растворителя Б в 0 мин до 85 % растворителя Б в 20 мин), затем 5 % растворителя Б с 21 по 28 мин. Скорость потока составляла 0,25 мл/мин, объем вносимого образца – 10 мкл.

Ферментативное восстановление фермента NADPH-цитохром P450 редуктазой (CPR). Ферментативное восстановление осуществляли в аликвотах (1500 мкл) в условиях пониженной концентрации растворенного кислорода. Данный эффект достигался использованием двойной циклической реакции в присутствии глюкозооксидазы (КФ 1.1.3.4), D-глюкозы и каталазы (КФ 1.11.1.6) [6]. Таким образом, каждая аликвота содержала смесь TXAS и NADPH-цитохром P450 редуктазу (CPR) в эквимольных концентрациях (1 мкМ), 1 мкМ пальмитиновой кислоты, 0,5 мМ D-глюкозы, 1 ед/мл глюкозооксидазы, 100 ед/мл каталазы. Аликвота, находящаяся в опытной кювете, барботировалась СО до насыщающей концентрации в течение 60 с. Реакция запускалась добавлением в аликвоты NADPH до концентрации 200 мкМ. Реакция проводилась в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4).

Разностный спектр поглощения для регистрации карбонильного комплекса восстановленного гема записывался в области 500–400 нм при 20 °С от 0 до 130 мин. Интервал записи спектра – 1,5 мин во временном промежутке до 20 мин, а затем 5 мин во временном промежутке до 130 мин.

Реконструкция ферментативной активности в присутствии редокс-партнера. Активность фермента реконструировали в аликвотах (500 мкл), содержащих смесь цитохрома P450 в концентрации 1 мкМ и CPR в концентрации 2 мкМ, субстрат (40 мкМ) и систему для регенерации NADPH – изоцитрат натрия (8 мМ), изоцитрат дегидрогеназу (1 ед/мл). Реакция проводилась в следующем буфере: 25 мМ HEPES (рН 7,4), 10 мМ $MgCl_2$, 0,1 % холат натрия.

Реакцию инициировали внесением NADPH (конечная концентрация 250 мкМ). Через определенные промежутки времени реакцию останавливали добавлением десятикратного объема метилхлорида и перемешиванием на вортексе. Содержимое пробирки центрифугировали 10 мин при 5000 g, отбирали верхний слой, остаток упаривали под аргоном и анализировали на ВЭЖХ системе, оснащенной колонкой ZORBAX Extend C18 (2,1 × 150 мм, размер частиц 1,8 мкм) с проточным оптическим и масс-спектрометрическим детектором Q-TOF 6550 iFunnel (Agilent Technologies, США). Состав подвижной фазы был следующим: градиент растворителя Б (0,2 %-ная муравьиная кислота в ацетонитриле) в растворителе А (0,2 %-ная муравьиная кислота). Программа разделения заключалась в градиенте растворителя Б (от 5 % растворителя Б в 0 мин до 100 % растворителя Б в 28 мин), затем 5 % растворителя Б в 29 мин. Скорость потока составляла 0,3 мл/мин, объем вносимого образца – 15 мкл.

Компьютерное моделирование пространственной структуры фермента. Пространственные модели тромбоксансинтазы строили методом гомологичного моделирования с использованием сервера I-TASSER [7]. Стереохимическое качество моделей оценивали с помощью программы Procheck v.3.5.4 [8]. Молекулярный докинг пептидных молекул проводился с помощью веб-сервиса CABS-dock [9].

Молекулярная динамика комплексов проводилась с использованием пакета программ Amber16 (силовое поле GAFF для низкомолекулярных соединений, ff14SB для аминокислотных остатков и силовое поле для пентакоординированного гема в составе белка), в явном растворителе с применением функций термостата Ланжевана и баростата Берендсена.

Система проходила этапы минимизации энергии, нагрева и уравнивания с ограничениями подвижности аминокислотных остатков, а непосредственно молекулярная динамика проводилась без вышеназванных ограничений. Временной интервал динамики, для которого проводились расчеты, составил 100 нс.

Результаты и их обсуждение. *Скрининг лигандов активного центра тромбоксансинтазы человека среди жирных кислот и их производных.* Для изучения каталитических свойств рекомбинантной TXAS методом спектрофотометрического титрования был проведен скрининг потенциальных лигандов активного центра фермента. Результаты скрининга приведены в табл. 1.

U46619 (9,11-метаноэпокси PGH₂, табл. 1) является стабильным аналогом PGH₂, одновременно конкурентным ингибитором и миметиком PGH₂ по отношению к тромбоксановому рецептору (TXAR). Показано, что K_d комплекса с U46619 составляет $9,06 \pm 1,36$ мкМ, что согласуется с ранее полученными данными для рекомбинантной TXAS в липидных нанодисках [10]. С учетом спектральных параметров и результатов титрования TXAS U46619 можно с уверенностью заключить, что полученный нами препарат рекомбинантной TXAS соответствует природному ферменту в активной форме.

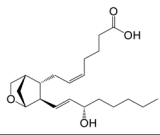
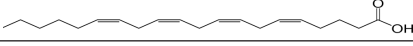
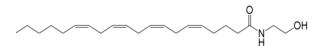
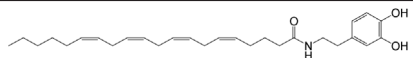
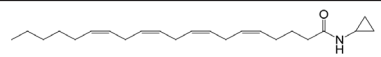
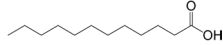
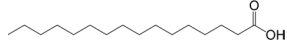
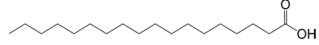
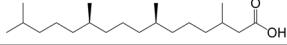
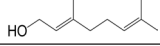
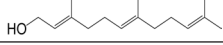
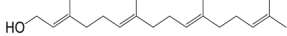
Арахидоновая кислота является природным предшественником PGH₂ и обладает высоким сродством к активному центру TXAS ($1,46 \pm 0,12$ мкМ), тогда как N-арахидонилов проявляют меньшее сродство (анандамид, НАДА и А-CPA), $4,36 \pm 0,51$, $4,09 \pm 0,39$, $10,08 \pm 1,66$ мкМ соответственно (табл. 1). Этот факт может быть объяснен нарушением стабилизации лиганда в активном центре из-за отсутствия взаимодействия карбоксильной группы и Arg413 [11; 12].

Наибольшей аффинностью к активному центру TXAS среди насыщенных жирных кислот обладает стеариновая кислота ($K_d = 0,29 \pm 0,04$ мкМ), меньшей – пальмитиновая ($K_d = 0,65 \pm 0,09$ мкМ) и лауриновая ($K_d = 4,09 \pm 0,54$ мкМ, рис. 2). **Аффинность взаимодействия увеличивается с увеличением длины алифатической цепи, что говорит о том, что немаловажным фактором в стабилизации лиганда является его взаимодействие с гидрофобными аминокислотными остатками активного центра.**

Метил-разветвленные жирные кислоты и их производные (фитановая кислота, гераниол, фарнезол, геранилгераниол) не вызывают спектральных изменений (табл. 1), свидетельствуя о том, что такая модификация исключает связывание лиганда с активным центром. Другим возможным механизмом является затруднение проникновения вещества в активный центр через канал доступа.

Т а б л и ц а 1. Результаты скрининга лигандов активного центра TXAS среди жирных кислот и их производных

T a b l e 1. The results of TXAS active site ligand screening among fatty acids and their derivatives

Лиганд Ligand	Структура Structure	Тип спектрального ответа Type of spectral response	ΔA_{\max}	K_d , мкМ K_d , μM
U46619		I тип	0,04	$9,06 \pm 1,36$
Арахидоновая кислота		I тип	0,07	$1,46 \pm 0,12$
Этаноламид арахидоновой кислоты (анандамид)		I тип	0,03	$4,36 \pm 0,51$
N-арахидонил-дофамин (НАДА)		I тип	0,07	$4,09 \pm 0,39$
N-арахидонил-циклопропиламин (А-СРА)		I тип	0,02	$10,08 \pm 1,66$
Лауриновая кислота		I тип	0,09	$4,09 \pm 0,54$
Пальмитиновая кислота		I тип	0,07	$0,65 \pm 0,09$
Стеариновая кислота		I тип	0,03	$0,29 \pm 0,04$
Фитановая кислота		н/о	–	–
Гераниол		н/о	–	–
Фарнезол		н/о	–	–
Геранилгераниол		н/о	–	–

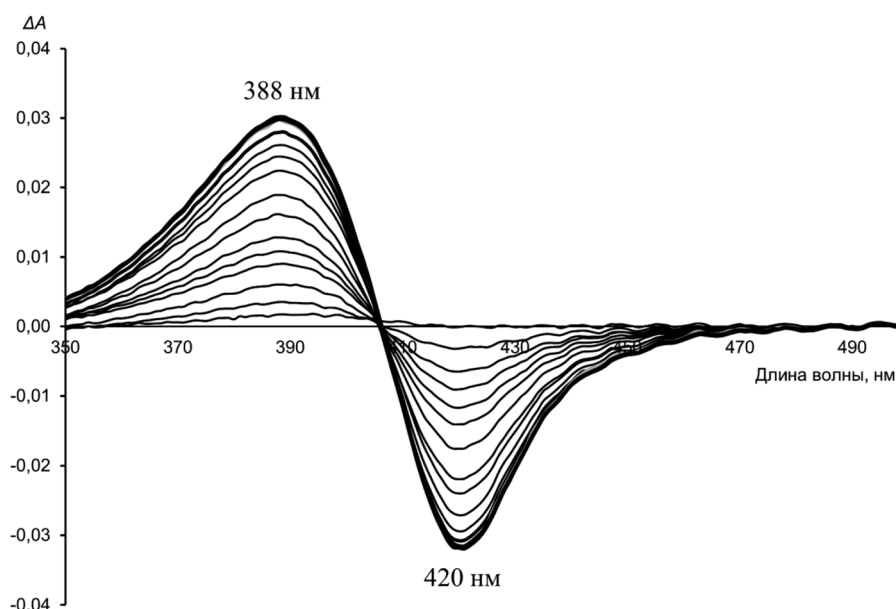


Рис. 2. Дифференциальный спектр, наблюдаемый при титровании TXAS лауриновой кислотой. Титрование проводилось при длине оптического пути 1 см в калий-фосфатном буфере с pH 7,4 концентрациями лауриновой кислоты от 100 нМ до 75 мкМ

Fig. 2. Differential spectrum obtained by titration of TXAS with lauric acid. Titration was carried out at an optical path length of 1 cm in potassium phosphate buffer (pH 7.4) and lauric acid concentrations from 100 nM to 75 μM

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что активный центр TXAS способен связывать различные лиганды, близкие по структуре простагландину H_2 , и могут выступать как в качестве потенциальных субстратов фермента, так и в качестве конкурентных ингибиторов.

Связывание жирных кислот предполагает наличие у TXAS **структурных особенностей**, характерных для семейства СУР4, осуществляющих $\omega(\omega-1)$ -гидроксилирование жирных кислот, которые проводят передачу различных воспалительных, аллергических и ответственных за сосудистый тонус регуляторных сигналов [13]. Возможно, что при определенных условиях в клетке TXAS может осуществлять монооксигеназные реакции, по «классическому» механизму. Гидроксилирование жирных кислот влияет на их биологическую активность, что в данном случае может служить механизмом тонкой регуляции синтеза метастабильного, но крайне высокоактивного тромбоксана A_2 .

Относительно высокая аффинность TXAS по отношению к жирным кислотам позволяет выдвинуть гипотезу о наличии в активном центре ферментов кластера гидрофобных аминокислотных остатков, взаимодействие с которыми вносит дополнительный вклад в стабилизацию субстрата, а также о возможном наличии функциональной нагрузки у такого взаимодействия. Кроме того, при оценке функциональной активности фермента необходимо учитывать возможность наличия в его микроокружении производных жирных кислот, обладающих высоким сродством к активному центру. Наличие таких взаимодействий внутри клетки может выступать дополнительным фактором регуляции TXAS.

Ферментативное восстановление тромбоксансинтазы NADPH-цитохром P450 редуктазой. Тромбоксансинтаза традиционно рассматривается как исключительно «неклассический» представитель семейства цитохромов P450, не требующий для осуществления катализа переноса электронов с восстановительного эквивалента, поэтому на данный момент не существует литературных данных о возможности ее восстановления NADPH в присутствии редокс-партнера. В то же время TXAS обладает спектральными свойствами, подтверждающими ее принадлежность к суперсемейству цитохромов P450. Поэтому мы выдвинули предположение о принципиальной возможности ферментативного восстановления данного фермента и впервые показали,

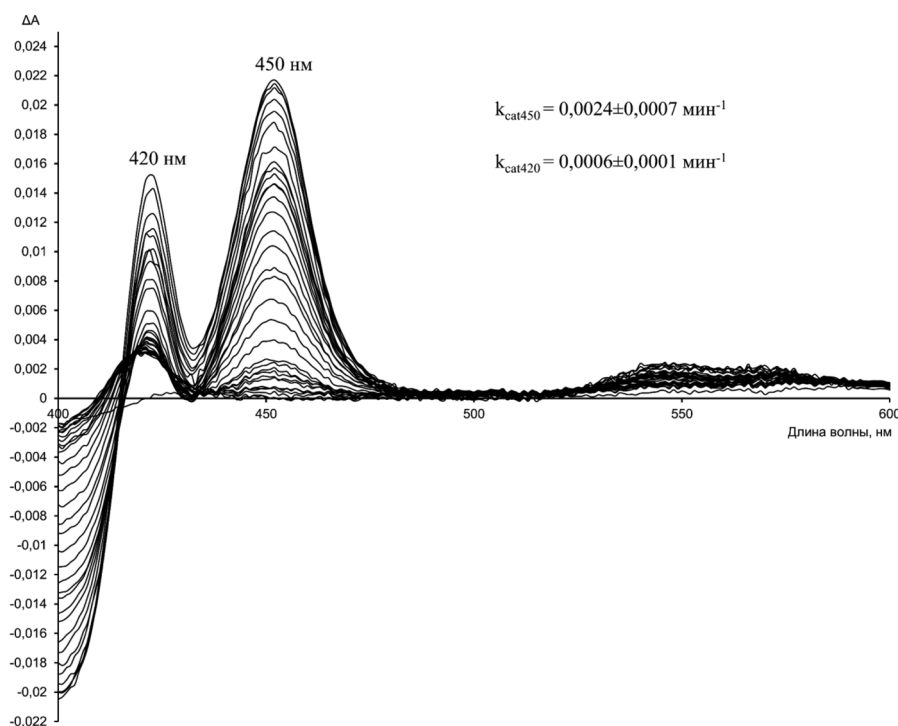


Рис. 3. Разностный кинетический спектр (0–130 мин) карбонильного комплекса TXAS, восстановленной NADPH-цитохром P450 редуктазой

Fig. 3. The difference kinetic spectrum (0–130 min) of the carbonyl complex of TXAS, reduced by NADPH-cytochrome P450 reductase

что, действительно, фермент способен принимать электроны в процессе ферментативного восстановления NADPH-цитохром Р450 редуктазой (CPR).

Процесс восстановления детектировался спектрофотометрически, путем регистрации увеличения поглощения карбонильного комплекса восстановленной формы фермента (450 нм) в реконструированной системе (рис. 3). Скорость данного процесса характеризуется кинетической зависимостью реакции нулевого порядка ($k_{\text{cat}450} = 0,0024 \pm 0,0007 \text{ мин}^{-1}$).

Параллельно с образованием карбонильного комплекса происходит образование неактивной формы цитохрома Р450 – Р420 (максимум поглощения на 420 нм). Скорость образования данной формы подчиняется такой же кинетической зависимости ($k_{\text{cat}420} = 0,0006 \pm 0,0001 \text{ мин}^{-1}$). Следует отметить, что восстановлению подвергается лишь часть фермента, находившегося в растворе – $0,32 \pm 0,12 \text{ мкмоль}$ ($32 \pm 12 \%$).

В результате проведенных исследований нами впервые показана возможность переноса электронов с NADPH при участии NADPH-цитохром Р450 редуктазы (компонент монооксигеназных систем микросомального типа, СYP II класса) на TXAS, что открывает возможность участия данного фермента в реакциях, требующих наличия белковых электрон-донорных систем для активации молекулярного кислорода.

Реконструкция изомеразной активности и влияние на нее различных эффекторов. Для оценки влияния CPR и других эффекторов на активность TXAS нами реконструирована ее специфическая ферментативная активность. Активность фермента оценивалась по стабильному продукту гидролиза основного продукта реакции – тромбоксану В₂ (TXB₂) (рис. 4, а), дополнительно, где это было возможно, проводились кинетические эксперименты для регистрации побочных продуктов реакции – 12-ННТ и малонового диальдегида (МДА) (рис. 4, б).

Активность препарата рекомбинантной TXAS по основному продукту реакции составляет $584,52 \pm 22,76$, $727,97 \pm 291,84 \text{ мин}^{-1}$ по 12-ННТ, $1262,62 \pm 432,33 \text{ мин}^{-1}$ по МДА, что сопоставимо с активностью тромбксансинтазы, полученной из тромбоцитов человека [14].

В качестве эффекторов были использованы CPR, CPR в присутствии насыщающей концентрации NADPH и синтетический высокоаффинный пептид (SGVYKVLVDWQH), взаимодействующий с тромбксансинтазой, последовательность которого нами была получена ранее в эксперименте по поиску пептидомиметиков тромбксансинтазы методом пептидного фагового дисплея

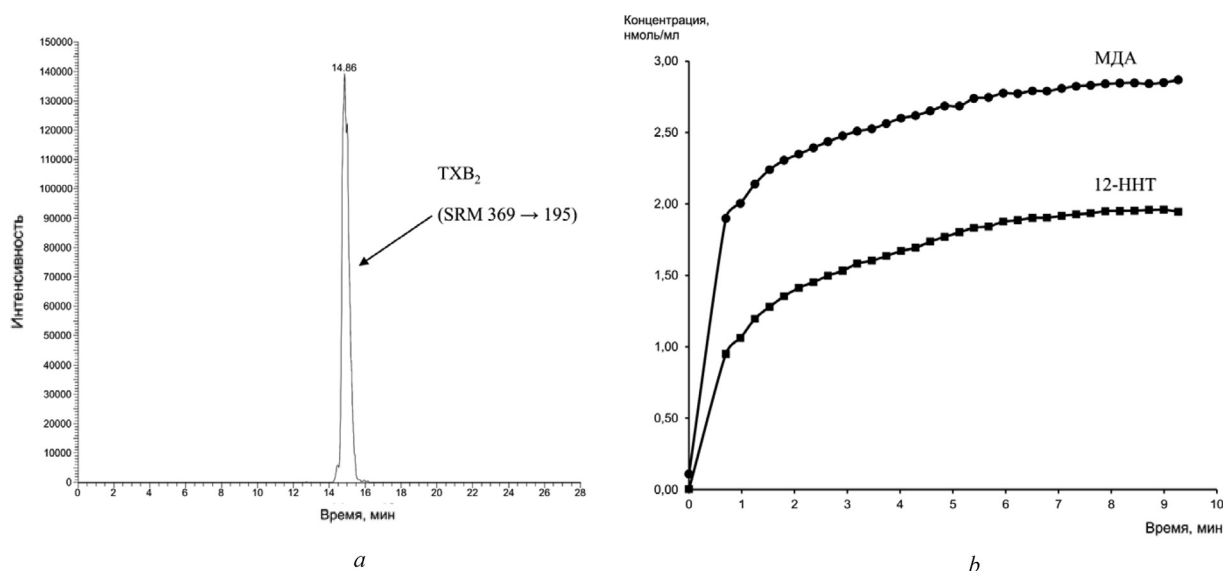


Рис. 4. Регистрация продуктов изомеразной реакции TXAS: а – результаты ВЭЖХ-МС анализа реакционной смеси с селективной детекцией на тройном квадруполе, содержащей конечный продукт изомеризации PGH₂ в TXA₂ (TXB₂); б – график кинетической зависимости реакции относительно побочных продуктов реакции (12-ННТ и МДА)

Fig. 4. Registration of products of the TXAS-catalysed isomerase reaction: а – results of an HPLC-MS analysis of a reaction mixture containing the final isomerization product of PGH₂ in TXA₂ (TXB₂) with selective detection on a triple quadrupole; б – kinetic dependence graph of reaction by-products (12-NHT and MDA) formation

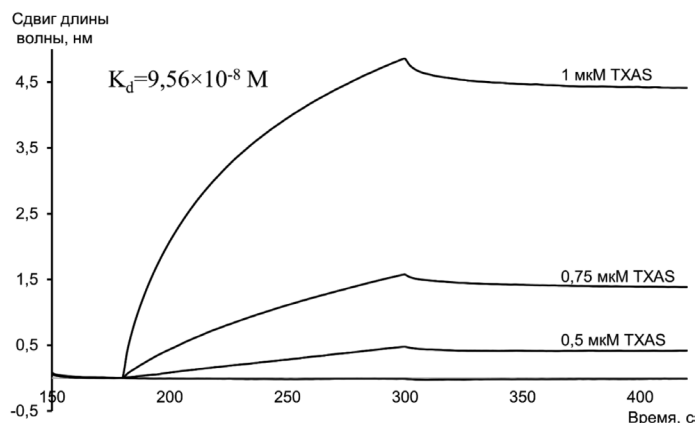


Рис. 5. Кинетические кривые, полученные методом биослойной интерферометрии, характеризующие связывание TXAS с иммобилизованным на матрице пептидом

Fig. 5. Kinetic curves, obtained by biolayer interferometry, characterizing the binding of TXAS to peptide immobilized on the matrix

[4]. Константа диссоциации комплекса пептида с TXAS, рассчитанная исходя из данных биослойной интерферометрии, составила $9,56 \cdot 10^{-8}$ М (рис. 5).

Данные молекулярного моделирования комплекса TXAS с пептидом показали преимущественную его локализацию с проксимальной стороны гема (рис. 6, *a*), области, ответственной за связывание редокс-партнера у микросомальных СУР. Комплекс остается стабильным на протяжении всего временного диапазона молекулярной динамики (100 нс), расчетные центры масс пептида и области связывания находились в пределах 6–10 Å друг от друга (рис. 6, *b*), что характеризует данное взаимодействие как прочное.

Анализ данных активности фермента в реконструированной системе показал (табл. 2), что в присутствии CPR и NADPH наблюдается снижение активности фермента до $47,24 \pm 3,87$ %, но при этом не детектируются побочные продукты реакции. Это может быть связано с конформационными изменениями фермента, индуцируемыми взаимодействием с редокс-партнером. Эти конформационные изменения могут стабилизировать субстрат в активном центре, направляя катализируемую реакцию по механизму, ответственному за образование основного продукта реакции. Фактором, запускающим этот процесс, вероятно, является присутствие восстановительного эквивалента, в пользу чего говорит то, что в случае наличия CPR, но отсутствия NADPH в среде, данный эффект не наблюдается, активность сохраняется.

Взаимодействие с десятикратным молярным избытком высокоаффинного пептида, предпо-

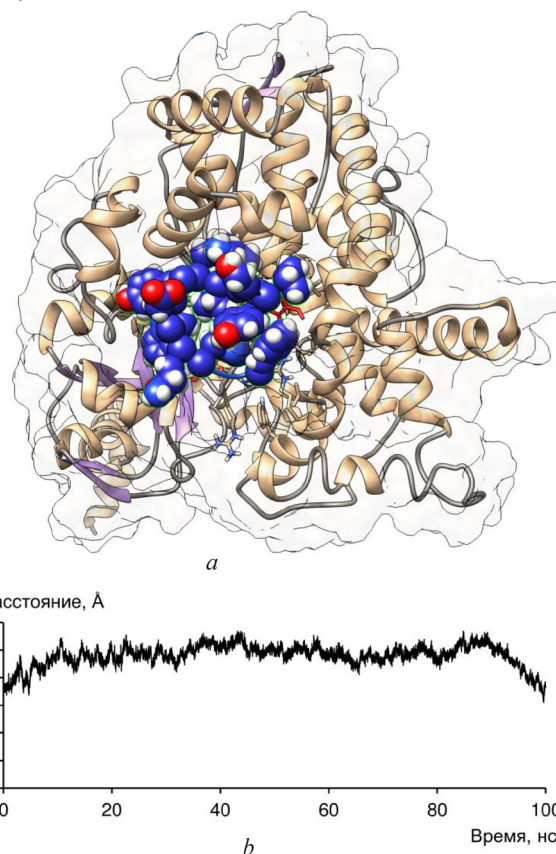


Рис. 6. Визуализация данных молекулярного докинга пептида к TXAS: *a* – трехмерная модель комплекса TXAS-пептид, где синим цветом изображен пептид; *b* – график динамики расстояния между центрами масс пептида и центра связывания на поверхности белка

Fig. 6. Visualization of molecular docking data of peptide to TXAS: *a* – 3D model of the TXAS-peptide complex, where the peptide color is blue; *b* – a graph of the dynamics of the distance between the peptide and the binding site on the surface of the protein centers of mass

Т а б л и ц а 2. Сравнение показателей активности фермента в присутствии различных эффекторов

T a b l e 2. Comparison of enzyme activity in the presence of various effectors

Условия реакции Reaction conditions	Активность фермента по TXB ₂ Enzyme activity based on TXB ₂ product	Активность фермента по 12-ННТ Enzyme activity based on 12-NHT product	Активность фермента по МДА Enzyme activity based on MDA product
Без добавления фермента	Продукт не детектируется	Продукт не детектируется	Продукт не детектируется
Стандартные условия	100 %	100 %	100 %
В присутствии CPR и NADPH	47,24 ± 3,87 %	Продукт не детектируется	Продукт не детектируется
В присутствии CPR	121,94 ± 10,51 %	103,55 ± 1,15 %	114,10 ± 1,68 %
В присутствии высокоаффинного пептида	93,34 ± 7,33 %	87,31 ± 0,52 %	83,57 ± 0,50 %

ложительно связывающегося с проксимальной, относительно гема, поверхностью TXAS, не влияет на специфическую активность фермента.

Нами сделано предположение о возможном наличии у TXAS гидроксилазной активности в реконструированной системе в присутствии CPR и NADPH. В качестве возможных субстратов использовались насыщенные жирные кислоты и производные арахидоновой кислоты (табл. 1). Анализ масс-спектров реакционной смеси, однако, не показал наличия гидроксированных продуктов реакции (данные не представлены). Таким образом, наличие у фермента гидроксилазной активности в присутствии CPR и NADPH остается не доказанным.

Скрининг лигандов активного центра тромбоксансинтазы среди производных имидазола и триазола. На данный момент отсутствует информация о взаимодействии тромбоксансинтазы с производными имидазола и триазола, используемыми в качестве противогрибковых препаратов широкого спектра действия и эффективных пестицидов, применяемых в сельском хозяйстве. Оценка данных взаимодействий представляет интерес для выявления соединений, способных модулировать активность тромбоксансинтазы и вызывать нежелательные побочные эффекты при их применении.

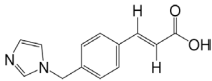
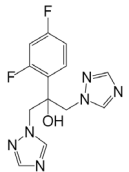
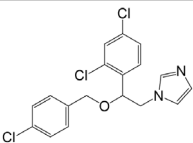
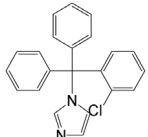
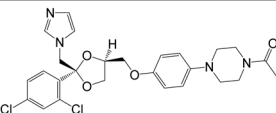
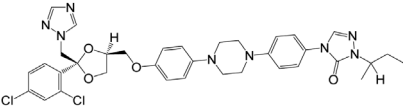
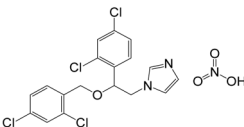
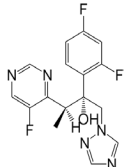
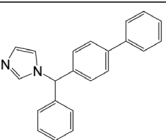
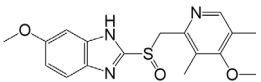
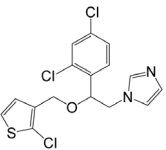
Скрининг лигандов активного центра рекомбинантной TXAS (табл. 3 и 4) среди производных имидазола и триазола показал, что большая группа соединений, используемых в настоящее время в качестве эффективных противогрибковых препаратов и высокоактивных пестицидов, обладает высокой аффинностью к активному центру фермента. Этот факт может говорить о наличии у данных соединений неспецифической ингибиторной активности по отношению к тромбоксансинтазе человека.

Нами показано, что из группы проанализированных азольных соединений наибольшей аффинностью к ферменту обладают клотримазол, эконазол, тиоконазол, бифоназол и кетоконазол (табл. 3) ($K_d = 0,26 \pm 0,05$, $0,28 \pm 0,04$, $0,29 \pm 0,0$, $0,37 \pm 0,07$ и $1,19 \pm 0,07$ мкМ соответственно). Аффинность этих соединений соразмерна или превышает таковую для озагреля – ингибитора тромбоксансинтазы, применяемого для снижения синтеза тромбосана A₂ [15]. Среди указанных препаратов лишь кетоконазол применяется системно и аккумулируется в крови в значительных концентрациях. При этом следует отметить, что одним из побочных эффектов кетоконазола является тромбоцитопения [16]. В связи с этим одним из факторов, вызывающих тромбоцитопению у больных, получающих препарат системно, может быть его способность неизбирательно ингибировать тромбоцитогенез посредством ингибирования активности TXAS, обусловленного высоким сродством к активному центру фермента.

При системном применении флуконазол, кетоконазол, итраконазол и вориконазол распределяются в большинстве тканей, органов и биологических жидкостей организма, присутствуя в них в высоких концентрациях. Системные азолы отличаются длительностью периода полувыведения: $T_{1/2}$ кетоконазола – около 8 ч, итраконазола и флуконазола – около 30 ч. Важно отметить, что азолы для местного применения (клотримазол, миконазол и др.) могут абсорбироваться через кожу. Например, при местном применении бифоназола 0,6–0,8 % абсорбируется здоровой кожей и 2–4 % – воспаленной. При вагинальном применении клотримазола абсорбция составляет 3–10 % [17]. Именно поэтому токсичность этих лекарственных препаратов может

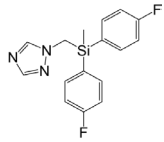
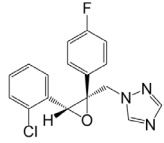
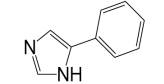
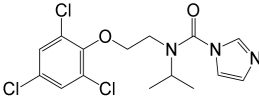
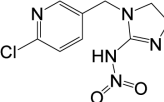
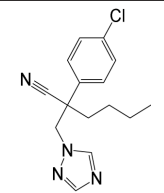
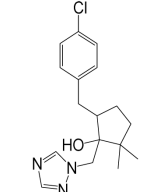
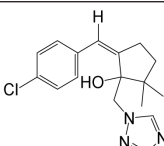
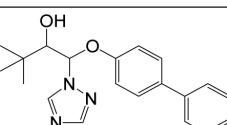
Т а б л и ц а 3. Результаты скрининга лигандов активного центра TXAS среди соединений азольной природы, применяемых в медицине

Table 3. The results of TXAS active site ligand screening among azoles used in medicine

Лиганд Ligand	Структура Structure	Тип спектрального ответа Type of spectral response	ΔA_{\max}	K_d , мкМ K_d , μM
Озагель		II тип	0,05	$2,30 \pm 0,36$
Флуконазол		II тип	0,05	$13,77 \pm 0,99$
Эконазол		II тип	0,07	$0,28 \pm 0,04$
Клотримазол		II тип	0,10	$0,26 \pm 0,05$
Кетоконазол		II тип	0,11	$1,19 \pm 0,07$
Итраконазол		н/о		
Миконазол		II тип	0,05	$2,36 \pm 1,19$
Вориконазол		II тип	0,03	$18,71 \pm 4,50$
Бифоназол		II тип	0,10	$0,37 \pm 0,07$
Омепразол		н/о		
Тиоконазол		II тип	0,09	$0,29 \pm 0,06$

Т а б л и ц а 4. Результаты скрининга лигандов активного центра TXAS среди соединений азольной природы, применяемых в сельском хозяйстве в качестве пестицидов

T a b l e 4. The results of TXAS active site ligand screening among azoles used in agriculture as pesticides

Лиганд Ligand	Структура Structure	Тип спектрального ответа Type of spectral response	ΔA_{\max}	K_d , мкМ K_d , μM
Флузилазол		II тип	0,07	$0,18 \pm 0,03$
Эпоксиконазол		II тип	0,04	$1,68 \pm 0,19$
4-Фенилимидазол		II тип	0,07	$10,48 \pm 1,03$
Прохлораз		II тип	0,05	$0,83 \pm 0,14$
Имидаклоприд		н/о		
Миклобутанил		II тип	0,07	$20,26 \pm 1,69$
Метконазол		II тип	0,08	$14,81 \pm 1,85$
Тритиконазол		II тип	0,03	$24,73 \pm 5,17$
Битерганол		II тип	0,02	$14,55 \pm 5,53$

приводить к развитию неспецифических побочных реакций со стороны кроветворной системы. Следует обратить внимание на то, что итраконазол, который является структурным гомологом кетоконазола, но обладает более объемной пространственной структурой, не связывается с активным ферментом, что говорит о том, что, скорее всего, возникают стерические затруднения при доступе этого соединения в активный центр. Наименьшие равновесные константы диссоциации характерны для производных имидазола, в то время как производные триазола имеют на порядок меньшую аффинность: K_d комплексов с флуконазолом и вориконазолом составила $13,77 \pm 0,99$ и $18,71 \pm 4,50$ мкМ соответственно.

Среди азолов, применяющихся в сельском хозяйстве (пестицидов, табл. 4) наибольшим сродством к ферменту обладают флузилазол, прохлораз и эпоксиконазол ($K_d = 0,18 \pm 0,03$ и $1,68 \pm 0,19$ мкМ соответственно). Флузилазол и эпоксиконазол применяются в качестве фунгицидов для обработки фруктов и пшеницы и обладают умеренным токсическим действием на человека. Прохлораз обладает доказанным антагонистическим действием на биосинтез стероидных гормонов, блокируя рецепторы этих гормонов [18] и ингибируя CYP17A1 [19] и ароматазу (CYP19A1) [20]. Тем не менее, можно сделать вывод, что высокая аффинность данных соединений к активному центру фермента может приводить к нежелательным токсическим эффектам на кроветворные клетки, снижая продукцию тромбоксанов.

Таким образом, скрининг лигандов TXAS среди производных имидазола и триазола показал, что высокоаффинное взаимодействие с ферментом характерно для соединений, являющихся производными имидазола и обладающих объемными гидрофобными заместителями по первому положению имидазольного кольца. Этот факт указывает на то, что для стабилизации лиганда в активном центре принципиальное значение имеет взаимодействие окружения азольного гетероцикла с аминокислотными остатками, образующими саму полость активного центра. При этом сам объем данной полости достаточно велик для того, чтобы связывать такие соединения, как кетоконазол, но в то же время не способен связывать более крупные молекулы, например, итраконазол.

Полученные нами данные позволяют сделать вывод о том, что идентификация ряда соединений с субмикромольной аффинностью к активному центру TXAS позволяет рассматривать данные лиганды в качестве потенциальных неселективных ингибиторов тромбоксан синтазы человека и что данные соединения могут вызывать неспецифические реакции со стороны кроветворной системы при приеме их в качестве противогрибковых препаратов или их накоплении в результате употребления продуктов питания обработанных фунгицидами.

Заключение. В настоящей работе нами определена субстратная специфичность тромбоксансинтазы человека по отношению к различным жирным кислотам и их производным. Показано взаимодействие TXAS как с арахидоновой кислотой, так и с ее производными и рядом насыщенных жирных кислот, в то время как метил-разветвленные липиды не способны образовывать комплексы с активным центром фермента. Впервые показан перенос электронов с NADPH на TXAS с помощью NADPH-цитохром P450 редуктазы. Вместе с тем присутствие NADPH-цитохром P450 редуктазы в реакционной смеси снижает изомеразную активность TXAS и перенаправляет реакцию по механизму, ответственному за образование основного продукта. Во внутриклеточных условиях это может служить дополнительным механизмом регуляции фермента, продуктом реакции которого являются метастабильные, но крайне высокоактивные метаболиты.

Скрининг лигандов тромбоксансинтазы человека среди производных имидазола и триазола выявил соединения, способные с высокой аффинностью связываться с TXAS и, вероятно, эффективно ингибировать активность, при этом большей аффинностью характеризуются производные имидазола с гидрофобным заместителем по первому положению. Таким образом, прием этих соединений в качестве противогрибковых препаратов или употребление продуктов питания, обработанных фунгицидами, может приводить к нежелательным побочным эффектам со стороны кроветворной системы из-за неселективного ингибирования тромбоксансинтазы. Эта информация дополняет понимание механизма действия веществ, нарушающих работу эндокринной системы человека (endocrine-disrupting chemicals, EDC).

Благодарности. Работа выполнялась при поддержке БРРФИ (грант X16P-062). Коллектив авторов выражает благодарность старшему научному сотруднику лаборатории белковой инженерии Я. В. Диченко за помощь в постановке *in silico* экспериментов.

Acknowledgments. This work was supported by the Belarussian Foundation for Basic Research (grant no. X16P-062). Authors acknowledge Ya. V. Dichenko for assistance in carrying out *in silico* experiments.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ullrich, V. Prostacyclin and thromboxane synthase as P-450 enzymes / V. Ullrich, H. Graf // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1984. – Vol. 5 – P. 352–355. doi.org/10.1016/0165-6147(84)90467-x
2. Ullrich, V. Thromboxane synthase. From isolation to function / V. Ullrich, R. Nüsing // *Stroke*. – 1990. – Vol. 21, N 12, Suppl. IV – P. 134–138.
3. Localization of thromboxane synthase in human tissues by monoclonal antibody Tü 300 / R. Nüsing [et al.] // *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* – 1992. – Vol. 421, N 3 – P. 249–254. doi.org/10.1007/bf01611182
4. Пептидный фаговый дисплей в скрининге пептидомиметиков тромбоксан синтазы / Д. О. Дормешкин [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2015. – Т. 59, № 2. – С. 53–60.
5. Locuson, C. W. Visible Spectra of Type II Cytochrome P450-Drug Complexes: Evidence that “Incomplete” Heme Coordination Is Common / C. W. Locuson, J. M. Hutzler, T. S. Tracy // *Drug Metab. Dispos.* – 2007. – Vol. 35, N 4. – P. 614–622. doi.org/10.1124/dmd.106.012609
6. Enzymatic Oxygen Scavenging for Photostability without pH Drop in Single-Molecule Experiments / M. Swoboda [et al.] // *ACS Nano*. – 2012. – Vol. 6, N 7. – P. 6364–6369. doi.org/10.1021/nn301895c
7. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction / J. Yang [et al.] // *Nat. Methods*. – 2014. – Vol. 12, N 1. – P. 7–8. doi.org/10.1038/nmeth.3213
8. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures / R. A. Laskowski [et al.] // *J. Appl. Crystallogr.* – 1993. – Vol. 26, N 2. – P. 283–291. doi.org/10.1107/s0021889892009944
9. Modeling of protein-peptide interactions using the CABS-dock web server for binding site search and flexible docking / M. Blaszczyk [et al.] // *Methods*. – 2016. – Vol. 93. – P. 72–83. doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.07.004
10. Functional Investigations of Thromboxane Synthase (CYP5A1) in Lipid Bilayers of Nanodiscs / A. Das [et al.] // *ChemBioChem*. – 2014. – Vol. 15, N 6. – P. 892–899. doi.org/10.1002/cbic.201300646
11. Identification of thromboxane A2 synthase active site residues by molecular modeling-guided site-directed mutagenesis / L. H. Wang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271, N 33. – P. 19970–19975. doi.org/10.1074/jbc.271.33.19970
12. Hsu, P.-Y. Identification of Thromboxane Synthase Amino Acid Residues Involved in Heme-Propionate Binding / P.-Y. Hsu, A.-L. Tsai, L.-H. Wang // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – Vol. 383, N 1. – P. 119–127. doi.org/10.1006/abbi.2000.2041
13. Edson, K. Z. CYP4 enzymes as potential drug targets: focus on enzyme multiplicity, inducers and inhibitors, and therapeutic modulation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) synthase and fatty acid ω -hydroxylase activities / K. Z. Edson, A. E. Rettie // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 13, N 12. – P. 1429–1440. doi.org/10.2174/15680266113139990110
14. Products, Kinetics, and Substrate Specificity of Homogeneous Thromboxane Synthase from Human Platelets: Development of a Novel Enzyme Assay / M. Hecker [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1987. – Vol. 254, N 1. – P. 124–135. doi.org/10.1016/0003-9861(87)90088-9
15. Uchida, Y. Effects of thromboxane synthetase inhibitors on cyclical reduction of coronary blood flow in dogs / Y. Uchida, S. Murao // *Jpn. Heart J.* – 1981. – Vol. 22, N 6. – P. 971–975. doi.org/10.1536/ihj.22.971
16. Effect of cytochrome P-450 inhibitors econazole, bifonazole and clotrimazole on prostanoid formation / H. C. Köfeler [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 130, N 6. – P. 1241–1246. doi.org/10.1038/sj.bjp.0703427
17. New Progress in Azole Compounds as Antimicrobial Agents / H.-Z. Zhang [et al.] // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 17, N 2. – P. 122–166. doi.org/10.2174/1389557516666160630120725
18. Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action / A. M. Vinggaard [et al.] // *Int. J. Androl.* – 2006. – Vol. 29, N 1. – P. 186–192. doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00604.x
19. Robitaille, C. N. Antiandrogenic Mechanisms of Pesticides in Human LNCaP Prostate and H295R Adrenocortical Carcinoma Cells / C. N. Robitaille, P. Rivest, J. T. Sanderson // *Toxicol. Sci.* – 2015. – Vol. 143, N 1. – P. 126–135. doi.org/10.1093/toxsci/kfu212
20. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells / J. T. Sanderson [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 182, N 1. – P. 44–54. doi.org/10.1006/taap.2002.9420

References

1. Ullrich V., Graf H. Prostacyclin and thromboxane synthase as P-450 enzymes. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1984, vol. 5, pp. 352–355. doi.org/10.1016/0165-6147(84)90467-x
2. Ullrich V., Nüsing R. Thromboxane synthase. From isolation to function. *Stroke*, 1990, vol. 21, no. 12, suppl. IV, pp. 134–138.
3. Nüsing R., Sauter G., Fehr P., Dürmüller U., Kasper M., Gudat F., Ullrich V. Localization of thromboxane synthase in human tissues by monoclonal antibody Tü 300. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology*, 1992, vol. 421, no. 3, pp. 249–254. doi.org/10.1007/bf01611182
4. Dormeshkin D. O., Svirid A. V., Gilep A. A., Usanov S. A. Screening of thromboxane synthase peptidomimetics by peptide phage display. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2015, vol. 59, no. 2, pp. 53–60 (in Russian).
5. Locuson C. W., Hutzler J. M., Tracy T. S. Visible Spectra of Type II Cytochrome P450-Drug Complexes: Evidence that “Incomplete” Heme Coordination Is Common. *Drug Metabolism and Disposition*, 2007, vol. 35, no. 4, pp. 614–622. doi.org/10.1124/dmd.106.012609
6. Swoboda M., Henig J., Cheng H.-M., Brugger D., Haltrich D., Plumeré N., Schlierf M. Enzymatic Oxygen Scavenging for Photostability without pH Drop in Single-Molecule Experiments. *ACS Nano*, 2012, vol. 6, no. 7, pp. 6364–6369. doi.org/10.1021/nn301895c

7. Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 2014, vol. 12, no. 1, pp. 7–8. doi.org/10.1038/nmeth.3213
8. Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S., Thornton J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 1993, vol. 26, no. 2, pp. 283–291. doi.org/10.1107/s0021889892009944
9. Blaszczyk M., Kurcinski M., Kouza M., Wieteska L., Debinski A., Kolinski A., Kmiecik S. Modeling of protein-peptide interactions using the CABS-dock web server for binding site search and flexible docking. *Methods*, 2016, vol. 93, pp. 72–83. doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.07.004
10. Das A., Varma S. S., Mularczyk C., Meling D. Functional Investigations of Thromboxane Synthase (CYP5A1) in Lipid Bilayers of Nanodiscs. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2014, vol. 15, no. 6, pp. 892–899. doi.org/10.1002/cbic.201300646
11. Wang L. H., Matijevic-Aleksic N., Hsu P. Y., Ruan K. H., Wu K. K., Kulmacz R. J. Identification of thromboxane A2 synthase active site residues by molecular modeling-guided site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, vol. 271, no. 33, pp. 19970–19975. doi.org/10.1074/jbc.271.33.19970
12. Hsu P.-Y., Tsai A.-L., Wang L.-H. Identification of Thromboxane Synthase Amino Acid Residues Involved in Heme-Propionate Binding. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, vol. 383, no. 1, pp. 119–127. doi.org/10.1006/abbi.2000.2041
13. Edson K. Z., Rettie A. E. CYP4 enzymes as potential drug targets: focus on enzyme multiplicity, inducers and inhibitors, and therapeutic modulation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) synthase and fatty acid ω -hydroxylase activities. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2013, vol. 13, no. 12, pp. 1429–1440. doi.org/10.2174/15680266113139990110
14. Hecker M., Haurand M., Ullrich V., Diezfalusy U., Hammarström S. Products, Kinetics, and Substrate Specificity of Homogeneous Thromboxane Synthase from Human Platelets: Development of a Novel Enzyme Assay. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1987, vol. 254, no. 1, pp. 124–135. doi.org/10.1016/0003-9861(87)90088-9
15. Uchida Y., Murao S. Effects of thromboxane synthetase inhibitors on cyclical reduction of coronary blood flow in dogs. *Japanese Heart Journal*, 1981, vol. 22, no. 6, pp. 971–975. doi.org/10.1536/ihj.22.971
16. Köfeler H. C., Fauler G., Windischhofer W., Leis H. J. Effect of cytochrome P-450 inhibitors econazole, bifonazole and clotrimazole on prostanoid formation. *British Journal of Pharmacology*, 2000, vol. 130, no. 6, pp. 1241–1246. doi.org/10.1038/sj.bjp.0703427
17. Zhang H.-Z., Gan L.-L., Wang H., Zhou C.-H. New Progress in Azole Compounds as Antimicrobial Agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2017, vol. 17, no. 2, pp. 122–166. doi.org/10.2174/1389557516666160630120725
18. Vinggaard A. M., Hass U., Dalgaard M., Andersen H. R., Bonefeld-Jørgensen E., Christiansen S., Laier P., Poulsen M. E. Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action. *International Journal of Andrology*, 2006, vol. 29, no. 1, pp. 186–192. doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00604.x
19. Robitaille C. N., Rivest P., Sanderson J. T. Antiandrogenic Mechanisms of Pesticides in Human LNCaP Prostate and H295R Adrenocortical Carcinoma Cells. *Toxicological Sciences*, 2015, vol. 143, no. 1, pp. 126–135. doi.org/10.1093/toxsci/kfu212
20. Sanderson J. T., Boerma J., Lansbergen G. W., van den Berg M. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2002, vol. 182, no. 1, pp. 44–54. doi.org/10.1006/taap.2002.9420

Информация об авторах

Свирид Андрей Васильевич – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: svirid.andrei@gmail.com.

Шapiro Михаил Анатольевич – мл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: mshapira2016@gmail.com.

Шагойко Павел Георгиевич – химик. Национальная антидопинговая лаборатория (аг. Лесной, 31, Минская область, Республика Беларусь). E-mail: pavell1sg@gmail.com.

Походня Юрий Георгиевич – канд. биол. наук, начальник отдела. Национальная антидопинговая лаборатория (аг. Лесной, 31, Минская область, Республика Беларусь). E-mail: pohodnia@yahoo.com.

Гилеп Андрей Александрович – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: agilep@iboch.bas-net.by.

Усанов Сергей Александрович – член-корреспондент, д-р хим. наук, профессор. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.

Information about the authors

Svirid Andrey Vasilievich – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220014, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: svirid.andrei@gmail.com.

Shapira Michail Anatolievich – Junior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220014, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mshapira2016@gmail.com.

Shahoika Pavel Georgievich – Chemist. National Anti-doping Laboratory (31, Lesnoy, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: pavell1sg@gmail.com.

Pakhadnia Yury Georgievich – Ph. D. (Biology), Head of the Department. National Anti-doping Laboratory (31, Lesnoy, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: pohodnia@yahoo.com.

Gilep Andrei Aleksandrovich – Ph. D. (Chemistry), Leading researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220014, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: agilep@iboch.bas-net.by.

Usanov Sergei Aleksandrovich – Corresponding Member, D. Sc. (Chemistry), Professor. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220014, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.