

Our developments in expression of intramolecular FRET biosensors optimized to connexin expression level allowed to follow the propagation and effects of cAMP permeability, IP3 and  $\text{Ca}^{2+}$  waves. The crucial approaches for intracellular FRET biosensors is to diminish the so called orientation dependent anisotropy component of FRET and to render the biosensors that they work as Stryer's "Spectroscopic ruler" by using long flexible linkers.

We will provide examples of highly sensitive intramolecular FRET based distance-dependent biosensors revealing metabolic cooperation of gap junction coupled cells under bacterial toxin induced increase PKA activity and  $\text{Ca}^{2+}$  signal propagation.

## **ВЛИЯНИЕ КЕТОКАНАЗОЛА НА БЕЛОК-БЕЛКОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ $\text{A}_2$ И ЦИТОХРОМА P-450**

**Антончик Г.Н., Гудко Т.Г., Ивуть Г.С., Литвинко Н.М.**

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Ранее нами с использованием спектроскопии кругового дихроизма (КД) показано неаддитивное изменение результирующего спектра КД смеси фосфолипазы  $\text{A}_2$  (КФ 3.1.1.4, ФЛА $_2$ ) и изоформы P-450 (КФ 1.14.14.1, CYP) - CYP3A4 по сравнению со спектрами КД индивидуальных белков, что свидетельствует о наличии их прямого белок-белкового взаимодействия, которое обеспечивается преимущественно гидрофобными связями. [1]. Производное имидазола – кетоканазол согласно литературным данным [2], является ингибитором CYP 3A4. Влияние кетоканазола на активность ФЛА $_2$  или смеси с CYP 3A4 не изучалось. Сравнение интенсивности гидролиза фосфатидилхолина в присутствии ксенобиотика, CYP3A4, а также смеси последних, позволяет оценить степень влияния ксенобиотиков на белок-белковое взаимодействие между ФЛА $_2$  и CYP3A4.

Задача настоящего исследования состояла в изучении скорости ферментативных реакций, катализируемых ФЛА $_2$  и цитохромом P450, в присутствии кетоканазола с целью возможной оценки биобезопасности фунгицидов с помощью сопряжения реакций монооксигеназного катализа и фосфолиполиза.

Имеются данные по сравнению кристаллических структур CYP3A4 с кетоканазолом (ингибитор) и эритромицином (субстрат), которые показывают, что при связывании с данными соединениями CYP3A4 подвергается

значительным конформационным изменениям. Полученные структуры представляют две различных конформации СУР3А4, потому что кетоконазол и эритромицин вызывают различные конформационные сдвиги. [2].

Каталитическую активность СУР3А4 определяли с использованием реакции *N*-деметилования эритромицина с образованием формальдегида, который идентифицировали в растворе с помощью реактива Нэша. Реакцию начинали добавлением эритромицина, проводили при 37 °С. Останавливали через 30 мин. [3]. На рис. 1 представлена прямо пропорциональная зависимость оптической плотности раствора при 412 нм от содержания формальдегида после обработки реактивом Нэша.

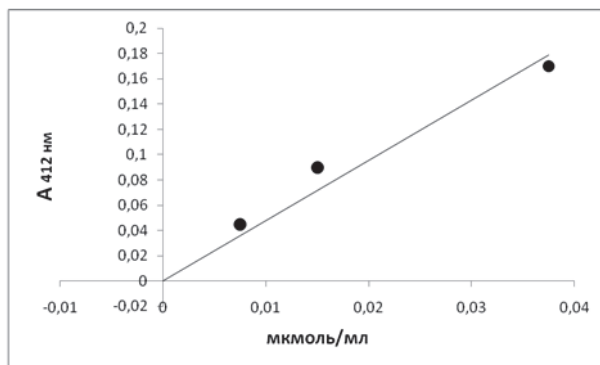


Рис. 1 – Зависимость оптической плотности раствора при 412 нм от содержания формальдегида после обработки реактивом Нэша

Установлено, что скорость реакции *N*-деметилования эритромицина составила 0,2093 нмоль/мин, добавление кетоконазола в реакционную смесь снижает скорость реакции более чем в 3 раза до 0,0698 нмоль/мин, присутствие ФЛА<sub>2</sub> поджелудочной железы свиньи дополнительно снижает скорость реакции в 2 раза до 0,0349 нмоль/мин. Увеличение ингибирования, по-видимому, связано с тем, что ФЛА<sub>2</sub> присоединяется к периферическому сайту связывания, что приводит к конформационным изменениям в СУР3А4, которые облегчают прохождение кетоконазола к активному центру.

Каталитическую активность ФЛА<sub>2</sub> определяли по степени гидролиза фосфатидилхолина и выражали как отношение количества фосфора в образовавшемся лизофосфатидилхолине к суммарному фосфору продукта и

непрореагировавшего исходного субстрата. Продукт отделяли от непрореагировавшего субстрата при помощи ТСХ. Содержание фосфора в продукте и субстрате определяли при помощи реактива Васьева. Для количественного определения влияния исследуемых эффикторов использовали величину относительной скорости  $V/V_0$  ( $V$  – скорость реакции гидролиза в присутствии эффиктора,  $\text{мкмоль}/(\text{мин} \cdot \text{мг})$ ,  $V_0$  – скорость реакции в контроле).

Установлено, что кетоканазол, противогрибковый препарат, оказывает незначительное действие на липолитическую реакцию, катализируемую ФЛА<sub>2</sub> (рис.2).

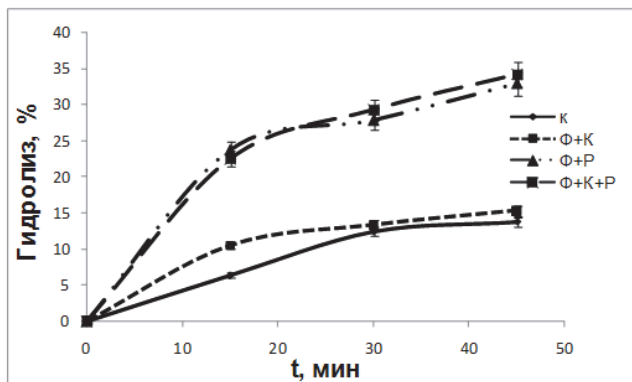


Рис. 2 – Зависимость от времени степени гидролиза фосфатидилхолина ФЛА<sub>2</sub> поджелудочной железы в составе липосом в присутствии Р-450 и кетоканазола (1,3  $\text{мкмоль}/\text{мл}$  ФХ, ФХ:Р-450=2000:1, 40  $\text{мкг}/\text{мл}$  ФЛА<sub>2</sub>, К- контроль, Ф – ФЛА<sub>2</sub>; К – кетоканазол; Р- СУРЗА4)

Кетоканазол активирует вышеуказанный фермент ( $V/V_0=1,65$ ). Выявлено, что преинкубация цитохрома Р-450 с кетоканазолом не влияет на активирующее действие цитохрома Р-450 ( $V/V_0=1,05$ ). Таким образом, основываясь на изменении скорости липолитической реакции, катализируемой ФЛА<sub>2</sub>, в присутствии ксенобиотика можно опосредованно судить о связывании исследуемого вещества с Р-450.

Полученные результаты по выявлению особенностей прямого и опосредованного белок-белкового взаимодействия ФЛА<sub>2</sub> и изоформы цитохрома Р-450 - СУРЗА4 в присутствии и отсутствие исследованных анти-

биотиков, проявляющих противогрибковое действие, подтверждают перспективность оценки биобезопасности фунгицидов с помощью сопряжения реакций монооксигеназного катализа и фосфолиполиза.

### **Литература**

1. Антончик, Г.Н. Изучение белок-белкового взаимодействия цитохрома P-450 и фосфолипазы A<sub>2</sub> / Г.Н. Антончик, Т. Г. Гудко // Весці НАН Беларусі, сер.хім. навук. – 2015, Ч. 1. - С. 3-5.
2. Ekroos, M., Sjögren, T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4 / M. Ekroos, T. Sjögren // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2006 - Vol. 103, № 37:- P.13682–13687.
3. Tu, Y.Y., Yang, C.S. High-affinity nitrosamine dealkylase system in rat liver microsomes and its induction by fasting / Y.Y. Tu, C.S. Yang // Cancer Res. – 1983 – Vol.43, №2 – P.623-629.

## **ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ ЯДРА СОЛИТАРНОГО ТРАКТА И ГИПОКАМПА ПРИ АКТИВАЦИИ АЛЬФА2-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ**

**Гладкова Ж.А., Токальчик Д.П., Пашкевич С.Г.**

*ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь*

Одним из побочных эффектов терапии гипертензивных состояний является ослабление памяти, механизм которого до сих пор неизвестен. С особенностями системного действия ряда антигипертензивных субстанций читатели знакомы из сообщений СМИ, когда у молодых и здоровых людей после употребления спиртного, быстро «отключается» сознание и наступает потеря памяти. Одной из причин развития такого состояния является клонидин, который поступает в организм вместе с алкоголем. Исследованию центральных механизмов действия гипотензивного препарата клонидина посвящено настоящее исследование. На основании литературных сведений [1,2] предположили, что изменение тонуса ретикулярной формации при активации альфа2-адренорецепторов структур каудальных отделов ствола головного мозга является определяющим в передаче информации между популяциями нейронов в процессе формирования памяти. С этой целью агонист альфа2-адренорецепторов – клонидин нанесли на слизистые оболочки полости носа крыс, а электрическую актив-