

где  $f_1$ ,  $f_2$  – силы осцилляторов электронного перехода молекул ПФ и ЭБ на длинах волн максимумов поглощения ПФ и ЭБ в составе гетерокомплекса;  $f_{\text{ПФ}}$ ,  $f_{\text{ЭБ}}$  – силы осцилляторов электронного перехода молекул ПФ и ЭБ на длинах волн  $\lambda_{\text{ПФ}}$  и  $\lambda_{\text{ЭБ}}$ .

Положение и интенсивности полос поглощения гетерокомплекса (см. рис. 2(1б)) позволяют предположить, что молекулы ПФ и ЭБ образуют, в основном, стопочные ассоциаты [5], и при этом, используя формулы (4), (5), оценить расстояние между взаимодействующими дипольными моментами переходов молекул и значение угла  $\varphi$ .

Выражение для  $G$ , характеризующее дипольную энергию, является функцией угловых переменных, т.е.  $G = G(\theta_{\text{ПФ}}, \theta_{\text{ЭБ}}, \varphi)$  при фиксированном расстоянии между дипольными моментами переходов. Зная угол  $\varphi$  и приравняв нулю частные производные по переменным  $\theta_{\text{ПФ}}$  и  $\theta_{\text{ЭБ}}$ :  $\frac{\partial G}{\partial \theta_{\text{ПФ}}} = 0$ ,  $\frac{\partial G}{\partial \theta_{\text{ЭБ}}} = 0$ , исходя из минимума потенциальной энергии взаимодействия  $\bar{\mu}_{\text{ПФ}}$  и  $\bar{\mu}_{\text{ЭБ}}$ , можно найти числовые значения  $\theta_{\text{ПФ}}$  и  $\theta_{\text{ЭБ}}$ .

Оценочные значения параметров гетерокомплекса ЭБ + ПФ равны:  $\theta_{\text{ПФ}} = \theta_{\text{ЭБ}} = \pi/2$ ,  $\varphi = 81^\circ$ ,  $R = 3.5 \text{ \AA}$ .

Предложенная методика изучения динамического равновесия разнородных молекул в растворе позволяет при совместной обработке экспериментальных спектров с использованием равновесных констант ассоциации молекул получить количественную информацию о структуре гетерокомплекса.

### Список литературы / References:

1. Барановский С.Ф., Глобина Е.В., Болотин П.А. Исследование самоассоциации фенантридинового красителя в водном растворе методом спектрофотометрии. *Вестник СевГТУ. Сер. Физика и математика*, 2004, вып. 59, с. 87-93. [Baranovskiy S.F., Globina E.V., Bolotin P.A. Investigation of self-association of phenanthridine dye in aqueous solution by means of spectrophotometry. *Research Journal of the Sevastopol State Technical University. Ser. Physics and mathematics*, 2004, vol. 59, pp. 87-93. (In Russ.)]
2. Бучельников А.С., Чернышев Д.Н., Милосердов П.Г., Барановский С.Ф. Спектрофотометрическое изучение ассоциирующих молекул красителей в водном растворе. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2011*, 2011, с. 139-141. [Buchelnikov A.S., Chernyshev D.N., Miloserdov P.G., Baranovskiy S.F. Spectrophotometric study of the associating dye molecules in aqueous solution. *Aktualnie voprosy biologicheskoy fiziki i himii. BPPC – 2011*, 2011, pp. 139-141. (In Russ.)]
3. Veselkov A.N., Evstigneev M.P., Veselkov D.A., Davies D.B. A general nuclear magnetic resonance analysis of hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution. *J. Chem. Phys.*, 2001, vol. 115, № 5, pp. 2252–2266.
4. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н. Исследование ассоциации красителей акридинового ряда методом протонного магнитного резонанса. *Хим. физика*, 1986, т. 5, с. 318-323. [Veselkov A.N., Baranovskiy S.F., Djimant L.N. *Study of the association of the acridine dyes by means of proton magnetic resonance*. *J. Chem. Phys.*, 1986, vol. 5, pp. 318-323. (In Russ.)]
5. Лазуркин Ю.С. *Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот*. М.: Наука, 1967, 323 с. [Yu.S. Lazurkin *Physical methods of investigation of proteins and nucleic acids*. М.: Nauka, 1967, 323 p. (In Russ.)]
6. Tinoco J. Hypochromism in polynucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, vol. 82, pp. 4785-4790.
7. Rhodes W. Hypochromism and other spectral properties of helical polynucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, vol. 83, pp. 3609-3617.

### ИНГИБИТОРЫ 5-ЛИПОКСИГЕНАЗ МОДУЛИРУЮТ $\text{Ca}^{2+}$ -ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ТРИФЛУОПЕРАЗИНОМ В МАКРОФАГАХ

Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г.

Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ

e-mail: cozy@mail.ru

**Аннотация.** С использованием флуоресцентного  $\text{Ca}^{2+}$ -зонда Fura-2AM впервые показано, что специфические ингибиторы 5-липоксигеназ зилеутон и каффеиковая кислота существенно подавляют  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, индуцируемые нейролептиком трифлуоперазином, в макрофагах. Результаты свидетельствуют об участии 5-липоксигеназ и/или продуктов 5-липоксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты во влиянии трифлуоперазина на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах.

**Ключевые слова:** трифлуоперазин, 5-липоксигеназы, макрофаги.

**5-LIPOXYGENASE INHIBITORS MODULATE  $\text{Ca}^{2+}$  RESPONSES INDUCED BY TRIFLUOPERAZINE IN MACROPHAGES**

Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G.

Saint-Petersburg State University

Universitetskaya emb., 7/9, Saint-Petersburg, 199034, Russia

e-mail: cozyzy@mail.ru

**Abstract.** Using Fura-2AM microfluorimetry it was shown for the first time that 5-lipoxygenase specific inhibitors zileuton and caffeic acid significantly inhibit  $\text{Ca}^{2+}$  responses, induced by neuroleptic trifluoperazine, in macrophages. The results suggest the involvement of 5-lipoxygenases and/or products of 5-lipoxygenase pathway of arachidonic acid cascade in the effect of trifluoperazine on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in macrophages.

**Key words:** trifluoperazine, 5-lipoxygenases, macrophages.

Трифлуоперазин (трифтазин, стелазин) относится к первому поколению типичных нейролептиков (антипсихотических агентов) фенотиазинового ряда, широко применяемых в терапии шизофрении и других психических заболеваний [1]. Выявлено многогранное влияние трифлуоперазина на внутриклеточные процессы [2]. Множественность эффектов трифлуоперазина, как и других фенотиазинов, может быть связана с его амфифильной природой. Будучи амфифильным соединением, он хорошо проникает через мембраны [3,4]. Благодаря этому, трифлуоперазин может модулировать внутриклеточные процессы, такие как передача сигналов и внутриклеточный транспорт.

Так, трифлуоперазин является антагонистом  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего белка кальмодулина, который играет ключевую роль в регуляции процессов  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации. Показано, что при связывании трифлуоперазина с комплексом  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин происходит формирование компактной глобулярной структуры, которая неспособна взаимодействовать с белками-мишенями [5]. Кроме того, показано, что фенотиазины влияют на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую активацию макрофагов и оказывают иммуномодулирующий эффект на перитонеальные макрофаги крыс [6].

Ранее нами было впервые обнаружено, что в среде, содержащей ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , трифлуоперазин вызывает в перитонеальных макрофагах крыс дозозависимое увеличение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) [7]. Однако механизмы, посредством которых трифлуоперазин вызывает увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в макрофагах, до конца не изучены.

На тромбоцитах человека ранее было показано, что психотропные соединения (трифлуоперазин, хлорпромазин, галоперидол и др.) модулируют вызываемое тромбином освобождение арахидоновой кислоты [8] и продукцию метаболитов циклооксигеназного и липоксигеназного путей окисления арахидоновой кислоты [9].

Для функционирования перитонеальных макрофагов, как мононуклеарных фагоцитов, важную роль имеют 5-липоксигеназы, активность которых приводит к образованию биологически активных продуктов лейкотриенов – медиаторов воспалительных и аллергических процессов [10].

В связи с этим представлялось целесообразным исследовать возможное участие 5-липоксигеназ во влиянии трифлуоперазина на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах.

В опытах использовали специфические ингибиторы 5-липоксигеназ кафеиковую (3,4-дигидроксициннамовую) кислоту [11] и противоастматический агент zileuton (N-[1-(1-бензотиен-2-ил)этил]-N-гидроксимочевина, Zyflo®) [12].

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar при комнатной температуре 20 - 22°C через 1 – 2 сут после начала культивирования клеток. Подробно процедура культивирования макрофагов и автоматизированная установка для измерения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия) описаны ранее [13]. Для измерения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм, эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  рассчитывали по уравнению Гринкевича [14]. Статистический анализ проводили с применением критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия при  $p \leq 0,05$ .

На рисунках приведены результаты типичных экспериментов. Данные представлены в виде графика изменения отношения интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (отношение  $F_{340}/F_{380}$ ) во времени, отражающего динамику изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в клетках в зависимости от времени измерения [15].

В контрольных экспериментах было показано, что при приложении 4 мкг/мл трифлуоперазина к макрофагам, находящимся в среде, содержащей ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , происходит быстрое повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  от базального уровня, равного  $92 \pm 17$  нМ, после чего наблюдается длительная фаза плато  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа (см. рис. 1а, 2а).  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  на фазе плато составляет  $221 \pm 25$  нМ (по данным 14 экспериментов).

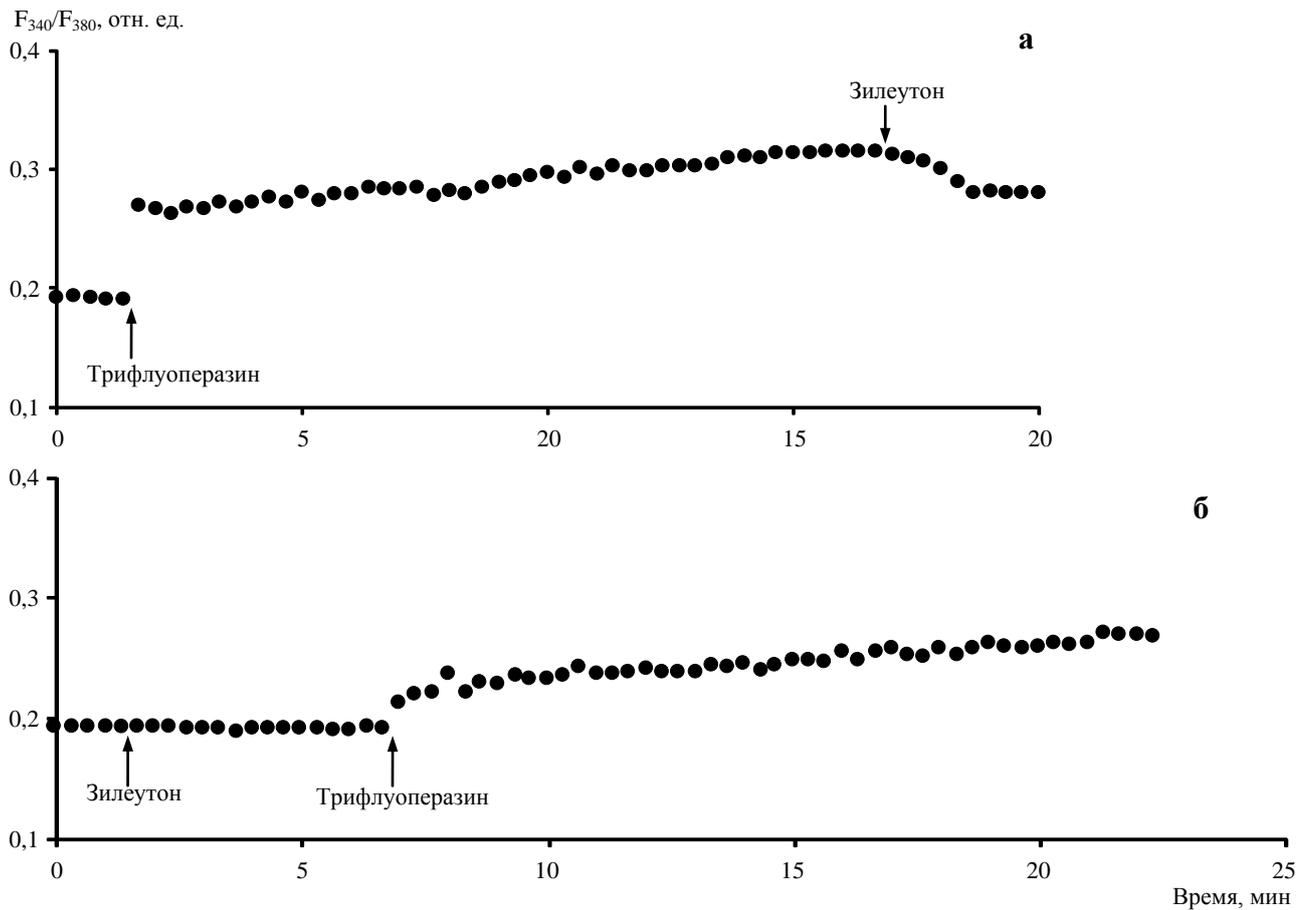


Рисунок 1 – Влияние зилеутона на  $Ca^{2+}$ -ответы, индуцируемые трифлуоперазином в макрофагах. Здесь и на рисунке 2 по оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM  $F_{340}/F_{380}$  при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.).

- а – к макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, содержащем ионы  $Ca^{2+}$ , добавляли 4 мкг/мл трифлуоперазина; на фоне развившегося  $Ca^{2+}$ -ответа вводили 4 мкМ зилеутона;  
 б – макрофаги, находящиеся в нормальном физиологическом растворе, инкубировали в течение 5 мин с 2 мкМ зилеутона, затем вводили 4 мкг/мл трифлуоперазина.

В настоящей работе нами впервые обнаружено, что преинкубация макрофагов с 2 мкМ зилеутона в течение 5 мин до введения 4 мкг/мл трифлуоперазина приводит к существенному подавлению  $Ca^{2+}$ -ответов, вызываемых трифлуоперазином (по данным 7 экспериментов на  $34,6 \pm 10,5\%$ ) (см. рис. 1б). Аналогичные результаты получены при использовании 10 мкМ кофеиновой кислоты (подавление  $Ca^{2+}$ -ответов составило  $61,4 \pm 14,2\%$  по данным 7 экспериментов) (см. рис. 2б).

Обнаружено также, что введение 4 мкМ зилеутона (см. рис. 1а) или 20 мкМ кофеиновой кислоты (см. рис. 2а) на фоне развившегося плато  $Ca^{2+}$ -ответа, индуцированного трифлуоперазином, вызывает уменьшение  $[Ca^{2+}]_i$  на  $33,5 \pm 8,2$  или  $46,3 \pm 12,4\%$ , соответственно (по данным 7 экспериментов для каждого из агентов).

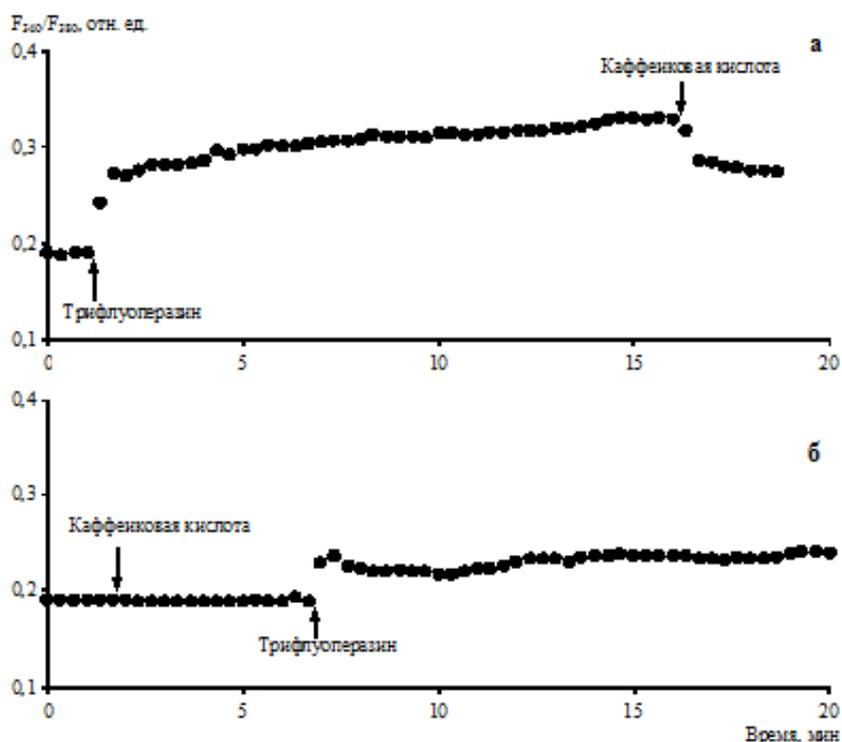


Рисунок 2 – Влияние кофеиновой кислоты на  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, индуцируемые трифлуоперазином в макрофагах:  
 а – к макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, содержащем ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , добавляли 4 мкг/мл трифлуоперазина; на фоне развившегося  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа вводили 20 мкМ кофеиновой кислоты;  
 б – макрофаги, находящиеся в нормальном физиологическом растворе, инкубировали в течение 5 мин с 10 мкМ кофеиновой кислоты, затем вводили 4 мкг/мл трифлуоперазина

Таким образом, нами впервые показано, что ингибиторы 5-липоксигеназ zileuton и кофеиновая кислота существенно подавляют  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, вызываемые нейролептиком трифлуоперазином в перитонеальных макрофагах крыс. Это свидетельствует об участии 5-липоксигеназ и/или продуктов 5-липоксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты во влиянии трифлуоперазина на  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в макрофагах.

Результаты согласуются с моделью встраивания (intercalation mechanism) амфифильных антипсихотических агентов, в том числе фенотиазиновых нейролептиков, во внутренний монослой мембраны, в котором локализованы анионные фосфолипиды. Показано, что трициклическое гидрофобное кольцо молекулы трифлуоперазина встраивается в гидрофобную фазу мембраны, в то время как алкильный фрагмент с терминальной аминогруппой взаимодействует с полярными головками кислых липидов [3,4]. Это может приводить к изменению жидкости мембраны и функционирования мембраносвязанных ферментов, таких как фосфолипаза  $\text{A}_2$ , запускающая каскад метаболизма арахидоновой кислоты и активацию 5-липоксигеназ.

Кроме того, полученные данные свидетельствуют о нежелательности совместного применения нейролептика трифлуоперазина и противоастматического агента zileutona.

#### Список литературы / References:

1. Dilsaver S.C. Antipsychotic agents: A review. *Amer. Fam. Phys.*, 1993, vol. 47, pp. 199-204.
2. Sudeshna G., Parimal K. Multiple non-psychiatric effects of phenothiazines: a review. *Europ. J. Pharmacol.*, 2010, vol. 648, pp. 6-14.
3. Oruch R., Lund A., Pryme I.F., Holmsen H. An intercalation mechanism as a mode of action exerted by psychotropic drugs: results of altered phospholipid substrate availabilities in membranes. *J. Chem. Biol.*, 2010, vol. 3, pp. 67-88.
4. Jaszczyszyn A., Gasiorowski K., Swiatek P., Malinka W., Cieslik-Boczula K., Petrus J., Czarnik-Matuszewicz B. Chemical structure of phenothiazines and their biological activity. *Pharmacol. Rep.*, 2012, vol. 64, pp. 16-23.
5. Feldkamp M.D., O'Donnell S.E., Yu L., Shea M.A. Allosteric effects of the anti-psychotic drug trifluoperazine on energetics of calcium binding by calmodulin. *Proteins*, 2010, vol. 78, pp. 2265- 2282.
6. Hadjimitova V., Bakalova R., Traykov T., Ohba H., Ribarov S. Effect of phenothiazines on protein kinase C- and calcium-dependent activation of peritoneal macrophages. *Cell Biol. Toxicol.*, 2003, vol., 19, pp. 3-12.
7. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Крутецкая Н.И., Бутов С.Н., Антонов В.Г.. Влияние трифлуоперазина на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах. *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация*, 2017, с. 188-192. [Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Krutetskaya N.I., Butov S.N., Antonov V.G. The influence of trifluoperazine on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in macrophages. *In: Receptors and intracellular signalling*, 2017, pp. 188-192 (in Rus)]

8. Oruch R., Pryme I.F., Holmsen H. Effects of psychotropic drugs on the thrombin-induced liberation of arachidonate in human platelets. *Saudi Med. J.*, 2008, vol. 29, pp. 1397-1407.
9. Walenga R.W., Opas E.E., Feinstein M.B. Differential effects of calmodulin antagonists on phospholipases A<sub>2</sub> and C in thrombin-stimulated platelets. *J. Biol. Chem.*, 1981, vol., 256, pp. 12523-12528.
10. Kuhn H., Banthiya S., van Leyen K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, vol. 1851, pp. 308-330.
11. Chung T.-W., Moon S.-K., Chang Y.-C., Ko J.-H., Lee Y.-C., Cho G., Kim S.-H., Kim J.-G., Kim C.-H. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *J. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 2004, vol. 18, pp. 1670-1681.
12. Wenzel S.E., Kamada A.K. Zileuton – the first 5-lipoxygenase inhibitor for the treatment of asthma. *Ann. Pharmacother.*, 1996, vol. 30, pp. 858-864.
13. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Крутецкая Н.И., Бутов С.Н., Антонов В.Г. Арр 2/3-комплекс участвует в действии глутоксима и моликсана на внутриклеточную концентрацию Ca<sup>2+</sup> в макрофагах. *Биофизика*, 2014, т. 59, вып. 5, с. 907-912. [Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Krutetskaya N.I., Butov S.N., Antonov V.G. Arp 2/3-complex is involved in the effect of glutoxim and molixan on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in macrophages. *Biophysica*, 2014, vol. 59, pp. 907-912 (in Rus.)]
14. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, pp. 3440-3450.
15. Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J.A. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, pp. 16559-16566.

#### СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ УЧАСТКОВ СВЯЗЫВАНИЯ АЗИДА НАТРИЯ С ДВУХДОМЕННОЙ ЛАККАЗОЙ *STREPTOMYCES LIVIDANS* AC-1709

Тищенко С.В.<sup>1</sup>, Габдулхаков А.Г.<sup>1</sup>, Трубицина Л. И.<sup>2</sup>, Лисов А. В.<sup>2</sup>, Леонтьевский А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук  
ул. Институтская, 4, г. Пуццино, 142290, РФ

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина РАН  
проспект Науки, 5, г. Пуццино, 142290, РФ  
e-mail:sveta@vega.protres.ru

**Аннотация.** Лакказы (ЕС 1.10.3.2) – фермент, принадлежащий к семейству «голубых» оксидоредуктаз, содержащих в активном центре четыре атома меди, организованные в металлоцентры Т1 и Т2/Т3. Т2/Т3 медь-содержащий центр включает Т2 центр с одним атомом меди и Т3 центр с двумя атомами меди. Лакказа катализирует окисление широкого спектра фенольных и нефенольных субстратов. Конечным акцептором электронов является кислород, который восстанавливается до воды. Лакказы обнаружены у грибов, бактерий, растений и насекомых. Лакказы эукариот состоят из трёх доменов, в бактериях, кроме трёхдоменных, встречаются двухдоменные (малые) лакказы. Двухдоменные лакказы обладают высокой термостабильностью, устойчивостью к высоким значениям рН и различным ингибиторам. Известно, что азид натрия является сильным ингибитором трёхдоменных лакказ, структурными методами показана его локализация в районе Т2/Т3-центра. Двухдоменные лакказы слабо ингибируются даже высокими концентрациями азид натрия, а их активность в среде со щелочным значением рН в присутствии азид натрия даже повышается. Место связывания азид натрия с двухдоменными лакказами не было определено.

В данной работе впервые обнаружено предположительное место связывания азид натрия с малой лакказой *Streptomyces sp. (lividans)* Ac-1709. Азид обнаружен на расстоянии около 5 Å от субстрат-связывающего кармана Т1-центра. В данной работе предложено объяснение низкой чувствительности двухдоменных лакказ к азиду натрия.

**Ключевые слова:** двухдоменные лакказы, азид натрия, пространственная структура, медь-содержащие центры.