

Королёва Полина Игоревна

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ЦИТОХРОМ P450-СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
ЭФФЕКТИВНОСТИ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ И АНАЛИЗА
МЕЖЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ**

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ)

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Шумянцева Виктория Васильевна

Официальные оппоненты:

Козин Сергей Александрович,
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, лаборатория конформационного полиморфизма белков в норме и патологии, главный научный сотрудник

Зиятдинова Гузель Камилевна,
доктор химических наук, профессор ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», профессор кафедры аналитической химии

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы"

Защита состоится «15» мая 2025 года в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.172.01 (Д 001.010.01) при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ и на сайте www.ibmc.msk.ru

Автореферат разослан «____» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Карпова Е. А

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Исследование ферментов, значимых с точки зрения синтеза биологически активных соединений, становится важным направлением развития биохимии и биотехнологий. Создание эффективных электрохимических систем для изучения каталитических свойств и субстрат-ингибиторного потенциала функционально значимых ферментов является быстроразвивающейся областью энзимологии.

Цитохромы P450 (CYP) – уникальный класс изоферментов, выполняющих функцию оксидаз и занимающие центральное место в процессе биотрансформации липофильных экзобиотиков [Ortiz de Montellano P.R., 2015]. Кроме того, эндогенные субстраты также подвергаются превращениям, катализируемым цитохромами P450. Например, под действием подсемейств цитохромов P450 4A, 4F и 4B жирные кислоты подвергаются ω -окислению, альтернативному пути окисления жирных кислот в организме [Wanders R.J.A. et al., 2011], изоформы цитохрома P450 2C8, 2C9, 3A4 и 1A1 участвуют в основном пути катаболизма *транс*-ретиноевой кислоты [McSorley L.C. et al., 2000], цитохром P450 2D6 участвует в альтернативном пути биосинтеза серотонина в мозге [Haduch A. et al., 2013].

Широкая субстратная специфичность и разнообразие химических реакций, катализируемых цитохромами P450, делает данный класс ферментов перспективным для разработки биосинтетических систем с целью получения продукта в препаративных количествах, и масштабированием процесса до промышленного синтеза значимых метаболитов. Примером такого использования является производство гиполипидемического лекарственного средства из группы статинов – правастатина, разработанного японской компанией Sankyo Co., Ltd (в настоящее время Daiichi Sankyo) [Nagaoka S., 2019].

Цитохромы P450 участвуют в I фазе биотрансформации гидрофобных веществ, попадающих в организм, в том числе лекарственных препаратов. Каждый из изоферментов цитохрома P450 может участвовать в метаболизме целого ряда различных по строению и свойствам веществ. Примерно 50 % всех лекарственных соединений подвергается метаболизму под действием цитохрома P450 3A4, 16% - P450 2C9, 13% - P450 2C19, 12% - P450 2D6 [Ortiz de Montellano P.R., 2015]. При таком многообразии метаболизируемых медицинских препаратов могут возникать нежелательные межлекарственные взаимодействия (МЛВ).

Существуют коммерческие системы для определения ингибиторных свойств веществ по отношению к изоформам цитохрома P450, например, Vivid® CYP450 Screening

Kits от компании Thermo Fisher Scientific. В основе таких наборов флуоресценция продукта цитохром Р450-зависимой реакции. Такие системы являются реконструированными, это делает их многокомпонентными, что может вносить ошибку в чувствительный метод флуоресценции. Кроме того, такие наборы не позволяют оценить влияние веществ, обладающих субстратными свойствами по отношению к цитохромам Р450.

Использование электрохимических систем является альтернативой реконструированным системам для исследования каталитической активности цитохромов Р450 *in vitro*, в таких системах перенос электронов осуществляется непосредственно от электрода к активному центру фермента, в отличие от реконструированных систем, применение которых, предполагает сложный комплекс белков редокс-партнеров, а также использование НАДФН. Кроме того, электрохимические методы позволяют использовать иммобилизацию препарата белка на электроде, что также дает дополнительные преимущества, миниатюризацию процесса определения каталитической активности, возможность использовать минимальное количество рекомбинантного белка для иммобилизации, разнообразие материалов для модификации поверхности электрода, придающим системе дополнительные свойства проводимости и сохранения нативной конформации фермента [Schneider E. and Clark D.S., 2013].

Таким образом, исследование каталитических свойств цитохромов Р450 с помощью электрохимических систем может быть использовано как для оценки субстрат-ингибиторного потенциала новых лекарственных веществ, так и для биосинтетического применения цитохромов Р450, а также для исследования межлекарственных взаимодействий.

Цель диссертационной работы: разработка электрохимических ферментных цитохром Р450-биосенсоров для исследования метаболических профилей лекарственных препаратов, изучения межлекарственных взаимодействий и создания эффективных систем биотрансформации биологически активных соединений.

В соответствии с целью работы были выделены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать каталитическую систему цитохрома Р450 3А4 с помощью многопараметрического электрохимического и кинетического анализа фермент-субстратных реакций для выявления возможных межлекарственных взаимодействий.
2. Смоделировать на электроде электрон-транспортную цепь переноса электронов к цитохрому Р450 с помощью нековалентных комплексов с флавинами для увеличения выхода продукта электроферментативных реакций цитохрома Р450 3А4 и Р450 2С9.

3. Оценить каталитическую эффективность цитохрома P450 3A4 при иммобилизации фермента в пространственно-упорядоченных наноструктурах на основе анодного оксида алюминия, содержащих нанопоры.
4. Разработать электрохимическую систему иммобилизации цитохрома P450 3A4 на основе мембранного порообразующего белка стрептолизина О.
5. Проанализировать эффективность использования электрохимических систем при иммобилизации бактосом, содержащих цитохром P450 3A4, для увеличения эффективности электрокаталитического процесса.

Личный вклад автора

Соискателем проработана отечественная и зарубежная литература по теме диссертации. Автор диссертационной работы непосредственно принимал участие в планировании и постановке экспериментов, самостоятельно проводил необходимые расчеты и статистическую обработку полученных экспериментальных данных. Представленные в диссертационной работе результаты исследований получены либо лично соискателем, либо при его непосредственном участии.

Научная новизна работы

Впервые характеристика значения потенциала начала катализа в циклической вольтамперометрии цитохромов P450 использована для оценки межлекарственных взаимодействий. Проведена оценка интерференции лекарственных препаратов, метаболизируемых цитохромом P450 3A4, применяемых для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, вызванных инфицированием *Helicobacter pylori*. С целью увеличения эффективности биокаталитической системы предложен подход, использующий образование на электроде фермент-субстратного комплекса в качестве первой стадии до электрохимического восстановления фермента. Впервые использованы нековалентные комплексы цитохрома P450 3A4 и P450 2C9 с флавиновыми кофакторами для иммобилизации на электроде, для увеличения выхода биоэлектрохимической реакции. Впервые предложена схема модификации электрода мембранным порообразующим белком стрептолизин О или пространственно-упорядоченными наноструктурами на основе анодного оксида алюминия, содержащими нанопоры, для иммобилизации цитохрома P450 3A4 с целью повышения эффективности биоэлектрокатализа.

Теоретическая и практическая значимость работы

Созданные электрохимические системы на основе цитохромов P450 3A4 и P450 2C9 могут быть использованы для исследования межлекарственных взаимодействий, и оценки субстратного или ингибиторного поведения лекарственных препаратов в отношении изоформ цитохрома P450. Разработанные подходы увеличения эффективности

электрокатализа цитохромов Р450 могут применяться для синтеза лекарственных веществ и синтетических производных стероидных гормонов.

Методология и методы исследования

В диссертационной работе использованы электрохимические системы на основе ферментов цитохромов Р450 (СYP3A4 и СYP2C9). Проведен анализ электрохимических параметров взаимодействия СYP3A4 с субстратами для оценки межлекарственных взаимодействий. Разработаны системы иммобилизации цитохромов Р450 позволяющие увеличить эффективность электрокаталитических реакций метаболизируемых изоферментами цитохромов Р450. Для оценки эффективности цитохром Р450-зависимых электрокаталитических реакций, проводился анализ продуктов реакции с помощью спектрофотометрии и с помощью разработанного в лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ двухэлектродного подхода, при котором продукт ферментативной реакции окисляется на электроде в положительной области потенциалов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Показано, что электрохимические и кинетические параметры цитохром Р450-биосенсоров, могут быть использованы для оценки межлекарственных взаимодействий.
2. Впервые исследовано влияние образования на электроде фермент-субстратного комплекса до стадии восстановления цитохрома Р450 как фактор, повышающий эффективность электроферментативной реакции.
3. Флавиновые кофакторы в качестве низкомолекулярных моделей НАДФН-зависимой цитохром Р450 редуктазы в нековалентных комплексах с цитохромом Р450, способствуют увеличению эффективности цитохром Р450-зависимой электрохимической реакции.
4. Материалы, образующие нанопоровые ансамбли на электроде, способствуют эффективной иммобилизации цитохрома Р450 для протекания электроферментативных реакций.
5. Бактосомы, содержащие цитохром Р450 и белки редокс-партнеры, при иммобилизации на электроде демонстрируют повышение каталитической активности, по сравнению с рекомбинантным ферментом.

Степень достоверности и апробация результатов

Полученные в работе результаты являются достоверными, что подтверждается методами обработки экспериментальных данных и адекватным статистическим анализом данных. Обсуждение результатов проведено с учетом современных данных биологических и медицинских наук. Научные положения и выводы, изложенные в

диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим материалом. Основные положения диссертационной работы были представленным на VIII Междисциплинарной конференции Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии, (Санкт-Петербург, 2023), «XX Всероссийской молодежной школьно-конференции по актуальным проблемам химии и биологии», (Владивосток, 2023), Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2023), XI Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2024», (Екатеринбург, 2024), Всероссийской конференции с международным участием «Биомедицинская химия: наука и практика» (Москва, 2024), Всероссийской научной конференции с международным участием «Биохимия человека 2024», (Москва, 2024).

Публикации по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 27 работ, из них 15 статей в рецензируемых научных журналах и 12 работ в сборниках трудов научных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 106 страницах машинописного текста, включает 29 рисунков и 16 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), материалов и методов (Глава 2), результатов и обсуждения (Глава 3), заключения, выводов и списка использованной литературы, состоящего из 187 источников.

Финансирование. Диссертационная работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100168-2), проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение No 075-15-2022-305), гранта Российского научного фонда № 23-25-00064, <https://rscf.ru/project/23-25-00064>.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Реактивы. Следующие реактивы использованные в работе были получены от ООО “Спектр-Хим” (Россия): аммоний уксуснокислый, чистота > 98 %, ацетат аммония, чистота > 98 %, гидроксид калия > 99 %, калий фосфорнокислый двузамещенный, чистота > 98 %, лимонная кислота, чистота > 98 %, натрий фосфорнокислый однозамещенный, > 98 %, уксусная кислота 99,9 %, хлорид натрия >99,9 %. Ацетилацетон чистота 99 % и флавинадениндинуклеотида натриевая соль дигидрат >90% получены от Fluka (Швейцария). Следующие реактивы использованные в работе были получены от “Sigma-Aldrich” (США): дидодецилдиметиламмония бромид (ДДАБ), чистота 98 %, диклофенак

натриевая соль, чистота $\geq 98,5\%$, рибофлавин, чистота $> 99\%$, хлороформ, чистота $\geq 99\%$, эритромицин, чистота $\geq 99\%$. Флавинаденинмононуклеотид, раствор для инъекций 10 мг/мл получен от “Фармстандарт” (Россия). Омепразол, чистота $\geq 99\%$ получен от “AstraZeneca” (Великобритания). Стрептолизин О из *Streptococcus pyogenes* (экспрессированный в *Escherichia coli* $\sim 1\,000\,000$ Ед/мг) и пероксидаза хрена (активность ~ 150 МЕ/мг) получены от Sigma-Aldrich (США).

Рекомбинантный фермент. Препарат рекомбинантного CYP3A4 концентрацией 142 мкМ и рекомбинантного CYP2C9 концентрацией 210 мкМ в 550 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,2% CHAPS, 1 мМ дитиотреитол и 20% глицерин получен в институте биоорганической химии НАН Беларуси. Рекомбинантные изоформы цитохрома P450 были модифицированы на N-конце. Чистота и концентрация фермента были установлены по характеристической полосе поглощения при длине волны 450–490 нм $\varepsilon_{450-490} = 91\text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$.

Бактосомы. CYP3A4 и цитохром P450-зависимая редуктаза человека были коэкспрессированы из *Escherichia coli* и дополнены очищенным цитохромом b_5 в триацетатном буфере (pH 7,6), содержащим 250 мМ сахарозы, 0,025 ЭДТА, конечная концентрация CYP3A4 составляла 4 мМ были закуплены Cypex Ltd (Великобритания).

Оборудование. Спектрофотометрические исследования проводили с помощью спектрофотометра Cary 100 Scan UV-Vis (“Agilent”, Нидерланды) и программного обеспечения Cary Win UV. Масс-спектрометрические исследования проводились сотрудником группы масс-спектрометрии ИБМХ Завьяловой М.Г. с помощью масс-спектрометра ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье FTICR MS Apex Ultra (Bruker, Германия) с ионизацией электроспреем (ESI), полученные данные анализировались с помощью программы Data Analysis 3.4 (Bruker Daltonics).

Электрохимические исследования проводили с помощью потенциостата Autolab302N (“Metrohm Autolab”, Нидерланды), снабжённого программным обеспечением NOVA (версия 2.0). В работе использовали трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ПГЭ) (ООО «КолорЭлектроникс», Россия); с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода 0,2 см (площадь 0,0314 см²). Электрохимические измерения в аэробных условиях – в пластиковой ячейке объёмом 1 мл. Все электрохимические измерения проводились при комнатной температуре ($22 \pm 3^\circ\text{C}$). Все электрохимические потенциалы в диссертационной работе приводятся относительно хлоридсеребряного (Ag/AgCl) электрода сравнения.

Навески взвешивали на электронных аналитических весах VIBRA (HT) (SHINKO DENSHI Co., Ltd., Япония) с точностью до 0,1 мг.

Измерение величины pH растворов проводили с помощью pH-метра inoLab Multi 740 Multimeter с комбинированным pH электродом SenTix 81 (WTW, Германия).

Приготовление ферментного электрода на основе рекомбинантных цитохромов CYP3A4 и CYP2C9, и бактосом содержащих CYP3A4, модифицированного дидодецилдиметиламмоний бромидом. Для приготовления ферментного электрода на поверхность рабочего графитового электрода в составе ПГЭ наносили 1 мкл раствора дидодецилдиметиламмоний бромида (ДДАБ) с концентрацией 0,1 М в хлороформе. После испарения хлороформа наносили 1 мкл 142 мкМ CYP3A4 (2 мкл бактосом содержащих CYP3A4 (CYP3A4BR)).

Для иммобилизации CYP3A4 и CYP2C9 нековалентно связанного с флавиновыми нуклеотидами или рибофлавином было выбрано соотношение концентраций 1:1. Для нанесения на электрод 1 мкл раствора рибофлавина (ФМН, ФАД) в калий-фосфатном буфере нужной концентрации 142 мкМ (210 мкМ) смешивали с 1 мкл 142 мкМ CYP3A4 (1 мкл 210 мкМ CYP2C9), и тщательно перемешивали, проводили инкубацию в течение 5 мин и затем наносили на поверхность ПГЭ/ДДАБ. Для контрольных экспериментов 1 мкл 142 мкМ CYP3A4 (1 мкл 210 мкМ CYP2C9) разбавляли 1 мкл буфера.

В качестве трехмерного пористого материала нами были использованы мембраны из анодного оксида алюминия (анодиски), содержащие сонаправленные поры диаметром 0,1 мкм (Anodisc 13, Whatman 0,1 μm , cat No.6809-7013) и 0,2 мкм (Anodisc 13, Whatman 0,2 μm , cat No.6809-7023). Для изготовления мембраны соответствующего диаметра анодиски нарезали на круги с помощью волоконного лазера «МиниМаркер 2».

Для приготовления ферментного электрода на поверхность рабочего графитового электрода в составе ПГЭ помещали мембрану из анодного оксида алюминия соответствующего диаметра, содержащую поры со средним диаметром 0,1 или 0,2 мкм, затем наносили 2 мкл 0,1 М ДДАБ в хлороформе, после испарения хлороформа (10 мин) наносили 1 мкл 142 мкМ CYP3A4.

Для модификации электрода стрептолизин О проводили послойное нанесение 1 мкл 0,1 М ДДАБ, после испарения хлороформа наносили 1 мкл предварительно проинкубированной 30 мин смеси равных объемов 4 мг/мл стрептолизина О и 10 мМ DL-дитиотреитола. После полного высыхания предыдущего слоя наносили 1 мкл 142 мкМ CYP3A4. Для иммобилизации фермента в составе модификатора на поверхности рабочего графитового электрода, электроды оставляли при температуре +4°C на 12 часов во влажной камере.

Электрохимические измерения. Перед началом всех электрохимических измерений электроды инкубировали в электролитном буфере (0,1 М калий-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0,05 М NaCl) в течение 10 мин при комнатной температуре. Все электрохимические измерения проводили в электролитном буфере (0,1 М калий-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0,05 М NaCl).

СУР3А4-зависимый электролиз проводили в течение 20 минут при контролируемом потенциале рабочего электрода -0,5 В, если не указано другое. СУР2С9-зависимый электролиз проводили в течение 90 минут при контролируемом потенциале рабочего электрода -0,6 В.

Электрохимические измерения в анаэробных условиях проводили в герметично закрытой плексигласовой ячейке с помещенным в нее ферментным электродом. Ячейку заполняли 1 мл электролитного буфера, герметично закрывалась, в течение 30 минут пропускался аргон. Параметры регистрации циклических вольтамперограмм: диапазон потенциалов от +0,1 до -0,7 В, скорости сканирования 0,01 до 0,1 Вс⁻¹. Циклическую вольтамперометрию ферментного электрода в аэробных условиях проводили в 1 мл электролитного буфера. Параметры регистрации циклических вольтамперограмм: диапазон потенциалов от -0,1 до -0,7 В, скорость сканирования 0,1 Вс⁻¹.

Определение N-деметилазной активности цитохрома Р450 3А4 по отношению к эритромицину. N-деметилазную активность СУР3А4 по отношению к эритромицину определяли по накоплению одного из продуктов реакции – формальдегида, который образует окрашенное соединение с реактивом Нэша (4 М ацетат аммония, 0,1 М ледяная уксусная кислота, 0,04 М ацетилацетон), коэффициент молярного поглощения образующегося соединения $\varepsilon_{412} = 4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Ферментный электрод помещали в электрохимическую ячейку с 1 мл электролитного буфера, содержащего 100 мкМ эритромицин, или содержащего 100 мкМ эритромицина и 100 мкМ омепразола. После проведения электрокатализа инкубационную смесь смешивали в соотношении 1:1 с реактивом Нэша и инкубировали при 37°C в течение 30 минут для развития окраски. Концентрацию формальдегида, образовавшегося в процессе электрокатализа, определяли на спектрофотометре при длине волны 412 нм.

Исследование гидроксилазной активности цитохрома Р450 3А4, по отношению к диклофенаку. Для исследования каталитической активности СУР3А4 по отношению к диклофенаку использовали методику регистрации тока электроокисления диклофенака на немодифицированном печатном графитовом электроде, измеренном до электролиза и после электролиза. Ферментный электрод помещали в электрохимическую ячейку с 1 мл электролитного буфера, содержащего 100 мкМ диклофенака. С этой целью на печатный

графитовый электрод, предварительно обработанный путем сканирования методом дифференциальной импульсной вольтамперограммы (ДИВА) в диапазоне потенциалов 0–1 В, четыре скана, наносили 2 мкл раствора, отобранного из электрохимической ячейки до электролиза, или после электролиза.

Исследование гидроксилазной активности цитохрома P450 2C9 по отношению к диклофенаку. Ферментный электрод помещали в электрохимическую ячейку с 350 мкл электролитного буфера, содержащего 100 мкМ диклофенака, проводили электролиз при потенциале -0,6 В в течение 90 мин. Для исследования каталитической активности CYP2C9 по отношению у диклофенаку использовали методику регистрации тока электроокисления продукта CYP2C9-зависимого окисления диклофенака 4'-гидроксидиклофенака на печатном графитовом электроде, модифицированном 1 мкл водной дисперсии 0,2 % одностенных углеродных нанотрубок (диаметр $1,6 \pm 0,4$ нм, длина ≥ 5 мкм, площадь поверхности 1000 м²/г) стабилизированных карбоксиметилцеллюлозой TUBALL™ BATT H2O десятикратно разбавленной дистиллированной водой. С этой целью модифицированный печатный графитовый электрод, предварительно обработанный путем сканирования методом квадратно-волновой вольтамперометрии (КВА) в диапазоне потенциалов 0–1,2 В, частоте 25 Гц, амплитуде 40 мВ, четыре скана, наносили 60 мкл раствора, отобранного из электрохимической ячейки после электролиза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Электрохимические системы на основе цитохрома P450 для моделирования межлекарственных взаимодействий

1.1. Многопараметричность электрохимического анализа цитохрома P450 как инструмент в исследовании межлекарственных взаимодействий

При исследовании цитохрома P450 электрохимическими методами исследователь получает возможность анализа нескольких характеристик, или параметров. Для систем в анаэробных условиях анализируют следующие параметры: E_c – потенциал катодного пика, E_a – потенциал анодного пика, полупотенциал пиков E^0 рассчитанный по формуле $E^0 = (E_{pc} + E_{pa})/2$, k_s – гетерогенная константа скорости переноса электронов, рассчитываемая по зависимости токов пиков от скорости сканирования (Таблица 1). Для аэробных условий информативен E_{red} – потенциал восстановления иона железа гема цитохрома P450, в аэробных условиях, для рекомбинантных ферментов данный параметр лежит в области потенциалов -0,3÷-0,5 В (отн. Ag/AgCl электрода сравнения), и может смещаться в положительную область потенциалов при использовании модификаторов

электродов, облегчающих скорость переноса электронов. E_{cat} - потенциал восстановления иона железа гема цитохрома P450 в присутствии субстрата. I_{red} - ток, отражающий взаимодействие восстановленной формы гема (Fe^{+2}) с кислородом, I_{cat} – каталитический ток, отражающий взаимодействия цитохрома P450 с органическим субстратом. Соотношение I_{cat}/I_{red} – индекс связывания, используется как мера эффективности каталитического процесса по отношению к органическому субстрату, показывая распределение потока электронов от активного центра цитохрома P450 между кислородом и субстратом. Количество электроактивного гемопротейна на электроде Γ_0 , ($\Gamma_0 = \frac{Q}{zAF}$, где Q - количество электричества (Кл), A - площадь рабочего электрода, cm^2 , z – количество электронов процесса, F - константа Фарадея (96485 Кл моль⁻¹). Еще одним параметром циклической вольтамперограммы цитохрома P450 в присутствии субстрата можно выделить потенциал начала катализа E_{onset} , различающийся по значению для разных субстратов.

Таблица 1. Электроаналитические параметры СYP3A4, иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ в анаэробных условиях.

Электрод	E_c , В	E_a , В	E^0 , В	ΔE , В	k_s , с ⁻¹	Γ_0 , моль/см ²
ПГЭ/ДДАБ/ СYP3A4	-0,377 ±0,008	-0,227 ±0,010	-0,302 ±0,010	-0,150 ±0,009	0,51 ±0,030	2,7±0,2 ×10 ⁻¹¹

Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трех независимых экспериментов. Данные получены в лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ и опубликованы в [Shumyantseva V.V. et al., 2023].

Проанализированы электрохимические параметры СYP3A4-сенсора (ПГЭ/ДДАБ/СYP3A4) при взаимодействии с субстратами СYP3A4: омепазол, тестостерон, диклофенак, эритромицин и кортизол (Таблица 2).

Таблица 2. Электрохимические параметры циклических вольтамперограмм ПГЭ/ДДАБ/СYP3A4 в присутствии 100 мкМ субстратов, скорость сканирования 0,1 Вс⁻¹.

Субстрат	E_{cat} , В	E_{onset} , В	I_{cat} , мкА	I_{cat}/I_{O_2}
Омепазол	-0,452 ±0,003	-0,200 ±0,004	-0,131±0,015 ×10 ⁻⁶	1,43±0,17
Тестостерон	-0,432 ±0,002	-0,202 ±0,003	-0,587±0,036 ×10 ⁻⁶	6,42±0,45
Диклофенак	-0,442 ±0,003	-0,210 ±0,005	-0,131±0,011 ×10 ⁻⁶	1,43±0,18
Эритромицин	-0,462 ±0,002	-0,215 ±0,007	-0,380±0,024 ×10 ⁻⁶	4,15±0,31
Кортизол	-0,462 ±0,003	-0,238 ±0,012	-0,145±0,012 ×10 ⁻⁶	1,59±0,16

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

Значение потенциала начала катализа, E_{onset} , можно использовать в качестве прогностического при анализе возможного межлекарственного взаимодействия. На основе полученных значений E_{onset} и анализа метаболитов CYP3A4-зависимых каталитических реакций был сделан вывод, что в первую очередь метаболизируется субстрат, имеющий более положительный потенциал начала катализа E_{onset} [Shumyantseva V.V. et al., 2022].

2. Повышение эффективности электрокатализа электрохимических систем цитохрома P450

2.1. Каталитический цикл цитохрома P450 и образование продуктивного фермент-субстратного комплекса как первый шаг к повышению эффективности электрокаталитических процессов

Предложен дизайн эксперимента, предполагающий предварительную инкубацию ферментного электрода с иммобилизованным цитохромом P450 в буфере, содержащем насыщающую концентрацию субстрата. Данный подход был использован для увеличения эффективности электрокатализа CYP3A4 в модельной системе по оценки эффективности реакции N-деметилирования эритромицина, и последующим количественным анализом продукта формальдегида, используя реакцию Ханша, с помощью реактива Нэша.

На рисунке 1 представлены циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ/CYP3A4, полученные после добавления субстрата эритромицина и после инкубации с субстратом в течение 30 мин. Как следует из рисунка 1, образование фермент-субстратного комплекса на электроде способствует существенному увеличению каталитического тока как характеристики, отражающей активность фермента (Таблица 3).

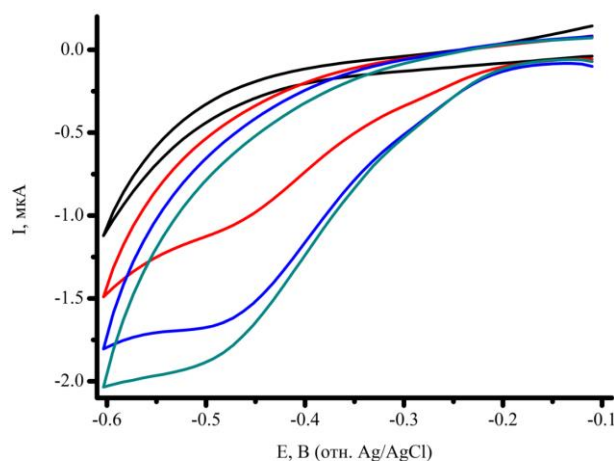


Рисунок 1. Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/CYP3A4 (красная линия), ПГЭ/ДДАБ/CYP3A4 после добавления 100 мкМ эритромицина (синяя линия), ПГЭ/ДДАБ/CYP3A4 после инкубации с 100 мкМ эритромицина в течение 30 мин (зеленая линия) при скорости сканирования 0,1 В с⁻¹.

Таблица 3. Влияние предварительного образования фермент-субстратного комплекса на электрохимические и электрокаталитические параметры ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4.

Электрод	Е, В	І, мкА	Относительная активность, %	V _{max} , М мин ⁻¹
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4	-0,453 ±0,011	-0,203 ±0,011	-	-
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 +Эритромицин	-0,462 ±0,005	-0,380 ±0,019	100±18	9.21±1.7 ×10 ⁻¹¹
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 +Эритромицин (30 мин прединкубации)	-0,472 ±0,009	-0,397 ±0,015	146±16	1.40±0.17 ×10 ⁻¹⁰

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

Предварительная инкубация ферментного электрода с субстратом, до стадии электрохимического восстановления СУР3А4, способствует смещению равновесия к образованию фермент-субстратного комплекса на электроде, что позволяет увеличить не только электрохимические характеристики системы, но и способствует увеличению максимальной скорости электроферментативной реакции N-деметилирования эритромицина.

2.2. Оптимизация электрон-транспортной цепи с помощью флавиновых кофакторов в качестве участников цепи переноса электронов на электроде

Разработана электрохимическая система, использующая для иммобилизации СУР3А4 в нековалентных комплексах с флавинами: рибофлавином, флавинмононуклеотидом (ФМН) и флавинадениндинуклеотидом (ФАД). Соотношение СУР3А4 и флавинов составляло 1:1. На рисунке 2 представлены циклические вольтамперограммы, характеризующие СУР3А4, и его нековалентные комплексы СУР3А4+рибофлавин, СУР3А4+ФАД, СУР3А4+ФМН.

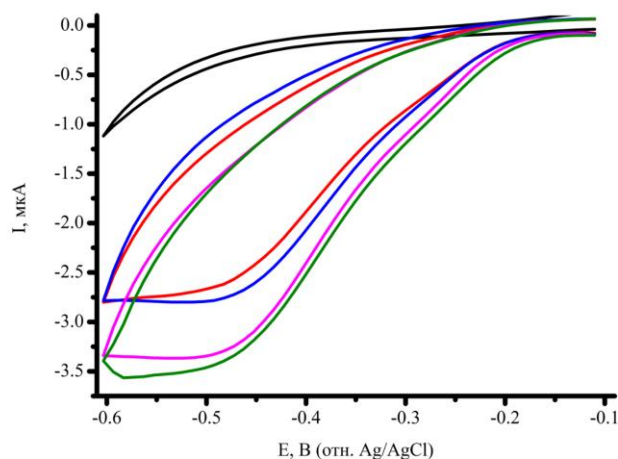


Рисунок 2. Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 (красная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4+рибофлавин (синяя линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4+ФАД (розовая линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4+ФМН (зеленая линия). Скорость сканирования $0,1 \text{ Вс}^{-1}$.

Потенциалы восстановления для всех комплексов были близки и не отличались от значения потенциала E_{red} для СУР3А4 равного $-0,462 \text{ В}$, и $E_{\text{red}} = -0,452 \text{ В}$ для комплекса с рибофлавином, $-0,462 \text{ В}$ для комплекса с ФАД, и $-0,462$ для комплекса с ФМН (Таблица 4). Данный пик соответствует восстановлению иона Fe^{3+} до Fe^{2+} в геме. Ток восстановления, I_{red} , и поверхностная концентрация электроактивного гемопротейна (Γ_0) возрастают в ряду ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4, ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4+рибофлавин, ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4+ФМН, ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 +ФАД, что подтверждает предположение о действии флавинов в качестве медиаторов электронного транспорта.

Таблица 4. Электрохимические характеристики нековалентных комплексов СУР3А4 и флавинов

Электрод	Е, В	І, мкА	Γ_0 , моль/см ²
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4	$-0,462 \pm 0,010$	$-0,634 \pm 0,042$	$3,60 \pm 0,25 \times 10^{-11}$
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4+рибофлавин	$-0,452 \pm 0,010$	$-0,818 \pm 0,065$	$4,89 \pm 0,34 \times 10^{-11}$
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4+ФАД	$-0,462 \pm 0,007$	$-0,943 \pm 0,054$	$5,55 \pm 0,46 \times 10^{-11}$
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4+ФМН	$-0,462 \pm 0,005$	$-0,877 \pm 0,073$	$5,18 \pm 0,39 \times 10^{-11}$

Данные рассчитаны из циклических вольтамперограмм при скорости сканирования $0,1 \text{ В/с}$. Представлены средние значения $\pm$ стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Метаболический процесс N-деметилирования субстрата эритромицина катализируемый СУР3А4, также был исследован для нековалентных комплексов СУР3А4 и флавинов, при потенциале $E = -0,5 \text{ В}$ и времени электролиза 20 мин. Полученные в результате этих экспериментов данные обобщены в таблице 5.

Таблица 5. Эффективность электрокатализа N-деметилования эритромицина в системах ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4+флавинов.

Электрод	Относительная активность, (%)	$V_{\max}$, $M_{\min}^{-1}$
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4	100±18	$9,21 \pm 1,7 \times 10^{-11}$
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4+рибофлавин	135±6	$1,24 \pm 0,07 \times 10^{-10}$
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4+ФАД	171±15	$1,58 \pm 0,14 \times 10^{-10}$
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4+ФМН	203±10	$1,87 \pm 0,19 \times 10^{-10}$
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4+ФАД +ФМН	189±15	$1,74 \pm 0,27 \times 10^{-10}$

Представлены средние значения $\pm$ стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Все предложенные системы увеличивали эффективность электрокатализа СУР3А4, наиболее эффективной является система с ФМН, в таком случае эффективность электрокатализа возрастала в 2 раза. Можно заключить, что отрицательно заряженная фосфатная группа в молекулах ФМН и ФАД может взаимодействовать с мембраноподобным модификатором электрода ДДАБ, заряженным положительно, благодаря атому азота с четырьмя заместителями.

Проведено исследование свойств нековалентных комплексов СУР2С9 и флавиновых нуклеотидов на ПГЭ/ДДАБ в аэробных условиях с помощью циклической вольтамперометрии, полученные циклические вольтамперограммы представлены на рисунке 3. На циклических вольтамперограммах наблюдается широкий пик восстановления $-0,425$ В для СУР2С9 и $-0,420$ В для СУР2С9+ФАД. В присутствии субстрата диклофенака наблюдается смещение потенциала восстановления в анодную область (таблица 6).

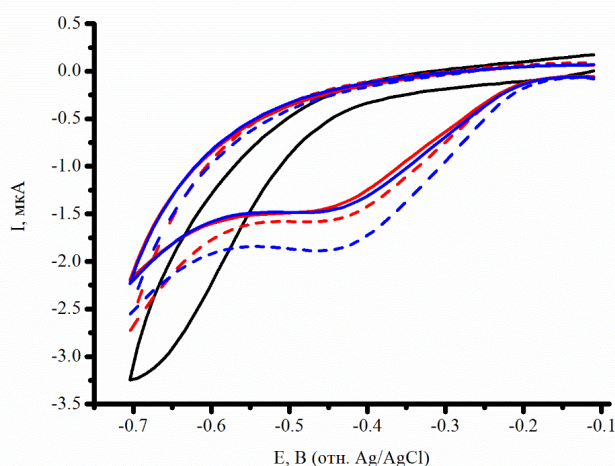


Рисунок 3. Циклическая вольтамперограмма ПГЭ/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9 (красная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9 в присутствии 100 мкМ диклофенака (красная прерывистая линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9+ФАД (синяя линия),

ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9+ФАД (синяя прерывистая линия) в присутствии 100 мкМ диклофенака. Скорость сканирования 0,1 Вс⁻¹.

Таблица 6. Электроаналитические параметры СУР2С9, СУР2С9+ФАД и СУР2С9+ФМН иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ

Электрод	E _{red} , В	E _{cat} , В	E _{onset} , В	I _{O2} , А	I _{df} , А	I _{df} /I _{O2}
ПГЭ/ДДАБ/ СУР2С9	-0,425 ±0,005	-0,402 ±0,017	-0,212 ±0,002	-4,2 ±0,5×10 ⁻⁷	-4,8 ±0,4×10 ⁻⁷	1,14
ПГЭ/ДДАБ/ СУР2С9 +ФАД	-0,420 ±0,008	-0,407 ±0,007	-0,211 ±0,001	-4,8 ±0,7×10 ⁻⁷	-6,5 ±0,6×10 ⁻⁷	1,35
ПГЭ/ДДАБ/ СУР2С9 +ФМН	-0,438 ±0,015	-0,418 ±0,005	-0,234 ±0,006	-1,24 ±0,4×10 ⁻⁷	-1,88 ±0,3×10 ⁻⁷	1,52

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

При использовании нековалентных комплексов СУР2С9 с флавидами ФАД и ФМН наблюдается увеличение соотношения каталитического тока в присутствии субстрата диклофенака к току восстановления в присутствии кислорода, так соотношение I_{df}/I_{O2} составляло 1,14 для СУР2С9, 1,35 для СУР2С9+ФАД и 1,51 для СУР2С9+ФМН. Оценка эффективности СУР2С9-зависимого окисления диклофенака проводилась по электроокислению продукта реакции 4'-гидроксидиклофенака. Каталитическая активность комплексов по отношению к диклофенаку возрастает. Максимальная скорость реакции СУР2С9 $V_{\max} = 1,89 \pm 0,21 \times 10^{-9}$ М·мин⁻¹, для комплексов СУР2С9+ФМН и СУР2С9+ФАД $V_{\max}$ увеличивается и составляет $2,14 \pm 0,16 \times 10^{-9}$ М·мин⁻¹ и $2,8 \pm 0,29 \times 10^{-9}$ М·мин⁻¹, соответственно, что свидетельствует об эффективности использования флавинов как низкомолекулярных моделей НАДФН-зависимой цитохром Р450- редуктазы.

2.3. Переход от 2D к 3D режиму иммобилизации цитохромов Р450 для повышения эффективности электрокатализа

Разработана система иммобилизации СУР3А4 на ПГЭ, использующая для создания трехмерной структуры на электроде мембраны из анодного оксида алюминия. Главным преимуществом мембраны на основе анодного оксида алюминия является химическая стабильность, высокоорганизованная и регулярная структура нанопор, а также коммерческая доступность. Мембрана имеет регулярное расположение пор для эффективного включения исследуемого белка. Средний размер мономеров цитохромов Р450 лежит в нанометровом диапазоне, что позволяет предположить возможность включение белка в поры. Были исследованы электрохимические параметры СУР3А4 иммобилизованного в анодосках 0,1 и 0,2 мкм, данные обобщены в таблице 7.

Таблица 7. Электрохимические характеристики и сравнение каталитической активности цитохрома P450 3A4 с использованием электродов, модифицированных мембранами из анодного оксида алюминия, содержащие сонаправленные поры.

Электрод	E_{red}, V	E_{cat}, V	Γ_0 , моль/см ²	I_{cat}/I_{red}	Относительная эффективность катализа, %
ПГЭ/ДДАБ/ СУР3А4	-0,432 ±0,008	-0,450 ±0,005	3,94 ±0,69×10 ⁻¹¹	0,99±0,21	100±9
ПГЭ/Anodisc 0,1/ДДАБ/ СУР3А4	-0,368 ±0,005	-0,385 ±0,021	7,11 ±4,79×10 ⁻¹²	1,12±0,8	232±4
ПГЭ/Anodisc 0,2/ДДАБ/ СУР3А4	-0,355 ±0,025	-0,402 ±0,017	6,78 ±2,97×10 ⁻¹²	0,77±0,17	132±5

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

Использование мембран из анодного оксида алюминия для модификации электрода позволяет сместить потенциал восстановления СУР3А4 и потенциал катализа эритромицина в анодную область, что способствует процессу переноса электронов между электродом и активным центром фермента и делает его термодинамически более выгодным. Несмотря на меньшее количество электроактивного белка на ПГЭ/Anodisc 0,1/ДДАБ/СУР3А4, каталитическая активность такой системы существенно превышает ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 (232%). Этот эффект может отражать сохранение каталитической активности фермента в порах пространственно-упорядоченных структур на основе анодного оксида алюминия.

Предложен подход, предусматривающий послойную модификацию поверхности рабочего электрода мембраноподобным веществом ДДАБ и мембранным белком стрептолизин О. Данный метод модификации электрода обеспечивает переход от планарной 2D поверхности к более развитой 3D поверхности за счет образования полостей в бислое, образованном ДДАБ. Такой подход способствует иммобилизации цитохрома P450, образование полостей на поверхности улучшает электрохимические свойства гемопroteина.

На циклических вольтамперограммах, изображенных на рисунке 4, в аэробных условиях зарегистрирован пик восстановления СУР3А4 в присутствии кислорода. Для электрода ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4 значение тока восстановления существенно возрастает по сравнению с ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4, с $-3,71 \pm 0,51 \times 10^{-7}$ А до $-9,01 \pm 1,59 \times 10^{-7}$ А. Полученные параметры представлены в таблице 8.

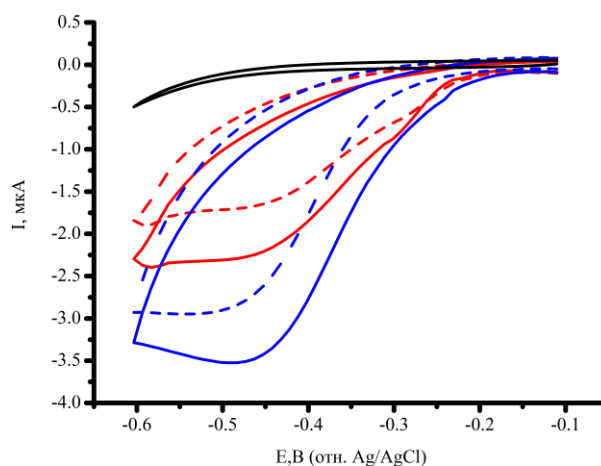


Рисунок 4. Циклическая вольтамперограмма ПГЭ/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУРЗА4 (красная прерывистая линия), ПГЭ/ДДАБ/СУРЗА4 в присутствии 100 мкМ эритромицина (красная линия), ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУРЗА4 (синяя прерывистая линия), ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУРЗА4 (синяя линия) в присутствии 100 мкМ эритромицина. Скорость сканирования 0,1 Вс⁻¹.

Таблица 8. Электроаналитические параметры СУРЗА4 иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ/SLO

Электрод	E _{red} , В	E _{cat} , В	E _{onset} , В	I _{O2} , А ×10 ⁻⁷	I _{Er} , А ×10 ⁻⁷	I _{Er} /I _{O2}	Чувстви- тельность, нА мкМ ⁻¹ см ⁻¹
ПГЭ/ДДАБ/SLO/ СУРЗА4	-0,462 ±0,001	-0,445 ±0,006	-0,264 ±0,020	-9,01 ±1,59	-12,22 ±2,49	1,57 ±0,17	389 ±45

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

Каталитический ток в системах ПГЭ/ДДАБ/СУРЗА4 и ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУРЗА4 регистрируется в присутствии субстратов кислорода и эритромицина, и повышается при использовании модификации со стрептолизинем О, со значения $-6,05 \pm 0,63 \times 10^{-7}$ А до $-12,22 \pm 2,49 \times 10^{-7}$ А, это также свидетельствует в пользу использования более развитой поверхности для скрининга субстратных свойств. Аналитическая чувствительность ПГЭ/ДДАБ/СУРЗА4 и ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУРЗА4 к эритромицину составляет 193 ± 21 и 389 ± 45 нА мкМ⁻¹см⁻¹, соответственно.

Данная система иммобилизации СУРЗА4 показала себя как эффективная для изучения каталитических свойств СУРЗА4 и способствовала увеличению эффективности электрокатализа с 100 ± 22 до $297 \pm 7\%$.

3. Использование морфологически замкнутых везикул – бактосом для изучения каталитической активности цитохрома P450 3A4

Исследованы электрохимические свойства бактосом, содержащих CYP3A4, цитохром b5 и CPR (CYP3A4BR), иммобилизованных на печатном графитовом электроде, модифицированном ДДАБ. Также исследованы электрокаталитические параметры взаимодействия с субстратами цитохрома CYP3A4 эритромицином и диклофенаком.

Изучение электроаналитических параметров иммобилизованного CYP3A4BR на ПГЭ/ДДАБ проводилось с помощью циклической вольтамперометрии в присутствии кислорода и 100 мкМ раствора субстрата (эритромицина или диклофенака), циклические вольтамперограммы представлены на рисунке 5 А, Б. На циклических вольтамперограммах в присутствии кислорода регистрируется широкий пик в области потенциалов $-0,432 \pm 0,014$ В, соответствующий восстановлению гема CYP3A4, флавиновых кофакторов ФМН и ФАД в активном центре CPR, и гема цитохрома b_5 (Таблица 9). В присутствии субстратов эритромицина и диклофенака наблюдается увеличение каталитического тока, что является характерной особенностью при взаимодействии цитохромов P450 с субстратом.

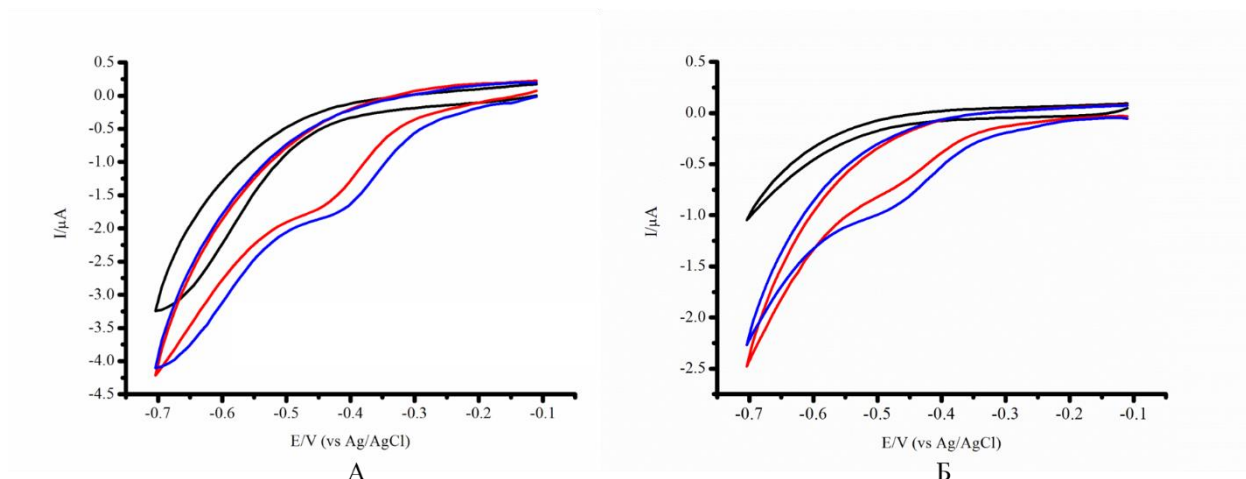


Рисунок 5. (А) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВР в присутствии кислорода (красная линия) и ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВР в присутствии 100 мкМ эритромицина и кислорода (синяя линия). (В) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВР в присутствии кислорода (красная линия) и ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВР в присутствии 100 мкМ диклофенака и кислорода (синяя линия).

Таблица 9. Электрохимические параметры ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВР.

Электрод	Субстрат	E_{red} , В	E_{cat} , В	E_{onset} , В	Аналитическая чувствительность, $A M^{-1}$	I_{cat}/I_{O_2}
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВР	Эритромицин	$-0,432 \pm 0,014$	$-0,417 \pm 0,023$	$-0,294 \pm 0,006$	$2,81 \times 10^{-3}$	$1,19 \pm 0,17$

ПГЭ/ДДАБ/ СУР3А4ВР	Диклофенак	-0,432 ±0,014	-0,469 ±0,006	-0,375 ±0,005	$1,16 \times 10^{-3}$	2,08 ±0,11
-----------------------	------------	------------------	------------------	------------------	-----------------------	---------------

Представлены средние значения $\pm$ стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Индекс связывания для СУР3А4ВР в случае диклофенака составляет $2,08 \pm 0,11$, и $1,19 \pm 0,17$ для эритромицина. Такое различие объясняется разницей в скорости диффузии лекарственных препаратов к активному центру СУР3А4 в бактосомах из-за различия в молярных массах. Молярная масса эритромицина составляет 733 гмоль^{-1} и значительно превышает молярную массу диклофенака 297 гмоль^{-1} .

Значения каталитических констант для систем ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4, ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВР составило $0,28 \pm 0,06 \text{ мин}^{-1}$ и $0,88 \pm 0,18 \text{ мин}^{-1}$, соответственно. Для сравнения кинетических параметров результаты были отнормированы по количеству электроактивного белка (моль). Каталитическая активность СУР3А4ВР превышает активность для рекомбинантного СУР3А4, в реакции N-деметилования эритромицина.

После протекания реакции СУР3А4-зависимого электрокаталитического 5-гидроксилирования диклофенака, эффективность оценивали с помощью проведения реакции электроокисления диклофенака на немодифицированном ПГЭ при положительных значениях потенциала. В таблице 10 обобщены электрокаталитические параметры систем ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 и ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВР. Показано, что в случае иммобилизации бактосом СУР3А4ВР, эффективность электрокатализа выше, чем в случае иммобилизации рекомбинантного препарата СУР3А4.

Таблица 10. Электрокаталитические свойства ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВР в реакции СУР3А4-зависимого гидроксилирования диклофенака при потенциале $-0,55 \text{ В}$, в течение 20 мин.

Электрод	I, нА*	Процент оставшегося диклофенака, %**	$V_{\max} \times 10^{-6}, \text{ Ммин}^{-1}$	$k_{\text{cat}}, \text{ мин}^{-1}$
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4	$15,05 \pm 0,5$	$72,5 \pm 2,4$	$1,375 \pm 0,12$	$4,98 \pm 0,48$
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВР	$11,03 \pm 3,1$	$53,2 \pm 7,4$	$2,34 \pm 0,37$	$17,59 \pm 2,73$

Представлены средние значения $\pm$ стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов. *I – ток электроокисления диклофенака. **Рассчитано из тока электроокисления диклофенака до электролиза $I(\text{диклофенак}) = 20,75 \pm 4,17 \text{ нА}$ (100%).

Значения каталитической константы сравнимы с данными, представленными в литературе $k_{\text{cat}} 13,2 \text{ мин}^{-1}$. С точки зрения создания биореактора, бактосомы проявили большую эффективность чем рекомбинантный фермент.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения диссертационной работы были разработаны эффективные электрохимические системы на основе СУР2С9 и СУР3А4.

Межлекарственные взаимодействия, происходящие при метаболизме лекарственных препаратов цитохромами Р450, могут приводить к нежелательным побочным и токсическим эффектам, поэтому создание эффективной системы скрининга, позволяющей в условиях *in vitro* предсказывать возможные межлекарственные взаимодействия является актуальной проблемой фармакологии и медицины. Разработана электрохимическая система на основе СУР3А4 позволяющая предсказывать межлекарственные взаимодействия по электрохимическим параметрам взаимодействия цитохрома Р450 с субстратом, показана прогностическая значимость потенциала начала катализа для оценки порядка взаимодействия субстратов с ферментом. Исследована модельная система на основе СУР3А4 моделирующая межлекарственное взаимодействие при терапии заболеваний ЖКТ при инфицировании *Helicobacter pylori*. Взаимное влияние ингибитора протонного насоса омепразола и макролидного антибиотика эритромицина на метаболизирующий их цитохром Р450 3А4, не оказывает влияния на метаболизм омепразола, однако, приводит к снижению скорости СУР3А4-зависимой реакции N-деметиляции эритромицина.

Актуальной задачей современной биотехнологии является создание биореакторов, позволяющих получать целевой продукт с минимальным количеством дополнительных шагов, таких как очистка от побочных продуктов и отделение от органических растворителей, для этих целей создаваться системы на основе цитохромов Р450 - уникальных биокатализаторов.

Разработан ряд подходов к увеличению эффективности электрокаталитических процессов цитохром Р450-систем. Впервые показано влияние времени прединкубации на скорость ферментативной реакции метаболизируемой СУР3А4. Исследована зависимость каталитического тока цитохрома Р450 от времени прединкубации электрода с субстратом. Так как первой стадией каталитического цикла цитохрома Р450 является образование фермент-субстратного комплекса, то увеличение времени взаимодействия фермента субстратом, предшествующему началу реакции, смещает равновесие к образованию фермент-субстратного комплекса, что соответственно увеличивает эффективность цитохром Р450-зависимого электрохимического процесса.

Впервые были иммобилизованы нековалентные комплексы цитохрома Р450 с флавиновыми нуклеотидами на поверхности печатного графитового электрода.

Поскольку, ФАД и ФМН являются простетическими группами НАДФН-зависимой цитохром Р450 редуктазы, реализован подход, в котором флавиновые кофакторы выполняют роль низкомолекулярных моделей редуктазы. Добавление в систему флавиновых нуклеотидов увеличивает электрохимические параметры иммобилизованного цитохрома Р450, способствуя увеличению скорости электрокаталитической цитохрома Р450-зависимой реакции.

Для моделирования условий клеточного окружения белка с целью сохранения его нативной конформации и каталитической активности, исследован переход от плоской поверхности электрода к развитой структуре. Увеличение площади поверхности было достигнуто двумя способами: использованием мембран из анодного оксида алюминия и порообразующим белком стрептолизин О. При использовании мембраны из анодного оксида алюминия, обладающей регулярной структурой, для модификации печатного графитового электрода, с последующей иммобилизацией СУР3А4, наблюдается смещение потенциала восстановления СУР3А4 в анодную область, что свидетельствует о более выгодном термодинамическом процессе. Кроме того, включение СУР3А4 в поры анодного оксида алюминия повышает эффективность электрокаталитического процесса.

Предложен новый подход к иммобилизации СУР3А4 в развитой поверхности, образованной порообразующим белком стрептолизин О, в такой системе стрептолизин О образует углубления в липидоподобном модификаторе ДДАБ. Данная модификация позволила увеличить ток восстановления СУР3А4 и повысить скорость СУР3А4-зависимой реакции N-деметилирования эритромицина.

Исследованы каталитические свойства систем на основе биотехнологических аналогов микросом – бактосом, содержащих СУР3А4, НАДФН-зависимую редуктазу и цитохром b5. Показано, что иммобилизованные микросомы проявляют большую каталитическую активность, по сравнению с рекомбинантным ферментом в пересчете на концентрацию иммобилизованного фермента.

Таким образом в работе показано, что электрохимические системы на основе цитохромов Р450 представляют особый интерес как для оценки субстрат-ингибиторного потенциала лекарственных препаратов *in vitro*, так и в качестве биотехнологических инструментов для получения новых лекарственных препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Показана эффективность электрохимических методов анализа цитохромов Р450 для исследования межлекарственных взаимодействий. Проведено *in vitro* моделирование антихеликобактерной терапии лекарственными препаратами, метаболизируемыми цитохромом Р450 3А4. Показано, что макролидный антибиотик эритромицин не оказывает существенного влияния на цитохромом Р450 3А4-зависимую биотрансформацию омепразола, в то время как омепразол, снижает скорость цитохромом Р450 3А4-зависимой реакции N-деметилирования эритромицина.
2. Подтверждено, что образование фермент-субстратного комплекса на электроде до стадии восстановления способствует повышению эффективности электроферментативной конверсии субстрата в $1,46 \pm 0,16$ раз. Использование нековалентного комплекса цитохрома Р450 с флавинами увеличивает скорость электрохимической цитохромом Р450 3А4-зависимой биотрансформации эритромицина. Нековалентный комплекс Р450 3А4 с ФМН, иммобилизованный на электроде, увеличивает максимальную скорость каталитической реакции $V_{\max}$ с $9,21 \pm 1,7 \times 10^{-11}$ до $1,87 \pm 0,19 \times 10^{-10}$ Ммин⁻¹ (в $2 \pm 0,6$ раза). При образовании нековалентного комплекса Р450 2С9 с ФАД максимальная скорость каталитической реакции $V_{\max}$ возрастает с $1,89 \pm 0,21 \times 10^{-9}$ Ммин⁻¹ до $2,8 \pm 0,29 \times 10^{-9}$ Ммин⁻¹ (в $1,5 \pm 0,3$ раза).
3. Применение для модификации электродов материалов, обладающих нанопоровой структурой, приводящей к образованию нанопоровых ансамблей на электроде, способствует эффективной иммобилизации цитохрома Р450. При модификации электрода мембранами на основе пористого оксида алюминия с диаметром пор 0,1 мкм, эффективность электрокаталитической реакции возросла в $2,32 \pm 0,04$ раза.
4. При использовании для модификации электрода порообразующего белка стрептолизина О регистрировалось увеличение максимальной скорости электрокаталитической реакции $V_{\max}$ с $1,52 \pm 0,34 \times 10^{-10}$ до $4,52 \pm 0,33 \times 10^{-10}$ Ммин⁻¹ (в $2,97 \pm 0,07$ раз).
5. Бактосомы, содержащие цитохром Р450 3А4 и белки редокс-партнеры, при иммобилизации на электроде более эффективно метаболизируют субстраты по сравнению с рекомбинантными белками без белков-партнеров. Каталитическая константа скорости N-деметилирования эритромицина возросла с $0,28 \pm 0,06$ до $0,88 \pm 0,18$ мин⁻¹ (в $3,14 \pm 1,29$ раз). Каталитическая константа скорости 5-гидроксилирования диклофенака возросла с $4,98 \pm 0,48$ до $17,59 \pm 2,73$ мин⁻¹ (в $3,53 \pm 0,88$ раз).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных журналах

1. Кузиков А.В., Булко Т.В., Королева П.И., Масамрех Р.А., Бабкина С.С., Гилеп А.А., Шумянцева В.В., Цитохром P450 3A4 как фермент биотрансформации лекарств: роль модификаций сенсорных систем в электрокатализе и электроанализе // Биомедицинская химия. – 2020. – Т. 66. - № 1. – С. 64-7.
2. Королева П.И., Кузиков А.В., Масамрех Р.А., Филимонов Д.А., Дмитриев А.В., Завьялова М.Г., Рыкова С.М., Ших Е.В., Махова А.А., Булко Т.В., Гилеп А.А., Шумянцева В.В., Моделирование межлекарственного взаимодействия омепразола и эритромицина с использованием цитохром P450-зависимой системы *in vitro* // Биомедицинская химия. – 2020. – Т.66. - №3. – С. 241-249.
3. Королева П.И., Шумянцева В.В., Разработка модельных систем на основе комплексов цитохрома P450 3A4 и рибофлавина для повышения эффективности электрокатализа // Биомедицина. – 2021. – Т. 17. - № 3Е. – С. 37-41.
4. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Koroleva P.I., Shikh E.V., Makhova A.A., Kisel M.S., Haidukevich I.V., Gilep A.A., Human Cytochrome P450 2C9 and Its Polymorphic Modifications: Electroanalysis, Catalytic Properties, and Approaches to the Regulation of Enzymatic Activity // Processes. – 2022. – V. 10. – № 2. – P. 383.
5. Shumyantseva V.V., Koroleva P.I., Bulko T.V., Sergeev G.V., Usanov S.A., Predicting drug-drug interactions by electrochemically driven cytochrome P450 3A4 reactions // Drug Metabolism and Personalized Therapy. – 2022. – V. 37. - № 3. – P. 241-248.
6. Шумянцева В.В., Королева П.И., Гилеп А.А., Напольский К.С., Иванов Ю.Д., Канашенко С.Л., Арчаков А.И., Повышение эффективности электрокатализа цитохрома P450 3A4 с помощью модификации электрода пространственно-упорядоченными наноструктурами на основе анодного оксида алюминия для исследования метаболических превращений лекарственных препаратов // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2022. –Т. 506. – С. 62-67.
7. Shumyantseva V.V., Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Filippova T.A., Koroleva P.I., Agafonova L.E., Bulko T.V., Archakov A.I., Enzymology on an Electrode and in a Nanopore: Analysis Algorithms, Enzyme Kinetics, and Perspectives // BioNanoScience. – 2022. – V. 12. – P. 1341-1355.
8. Shumyantseva V.V., Koroleva P.I., Bulko T.V., Shkel T.V., Gilep A.A., Veselovsky A.V., Approaches for increasing the electrocatalytic efficiency of cytochrome P450 3A4 // Bioelectrochemistry. – 2023. – V. 149. – 108277.
9. Koroleva P.I., Gilep A.A., Kraevsky S.V., Tsybruk T.V., Shumyantseva V.V., Improving the Efficiency of Electrocatalysis of Cytochrome P450 3A4 by Modifying the Electrode with Membrane Protein Streptolysin O for Studying the Metabolic Transformations of Drugs // Biosensors. – 2023. – V. 13. - № 4. – 457.
10. Shumyantseva V.V., Koroleva P.I., Bulko T.V., Agafonova L.E., Alternative Electron Sources for Cytochrome P450s Catalytic Cycle: Biosensing and Biosynthetic Application // Processes. – 2023. – V. 11. - № 6. – 1801.
11. Королева П.И., Булко Т.В., Агафонова Л.Е., Шумянцева В.В., Цитохромы P450: особенности механизмов катализа и электрокатализа для создания биосенсоров и биореакторов // Биохимия. – 2023. – Т. 88. - № 10. – С. 1993-2009.

12. Королева П.И., Шумянцева В.В. Сравнительный анализ биоэлектродокаталитических систем, содержащих цитохром P450 3A4 // *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. – 2024. – Т. 7. - № 1. - e00210.
13. Королёва П.И., Гилеп А.А., Шумянцева В.В., Цитохромы P450 как инструменты электроферментативного синтеза// *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. – 2024. – Т. 7. - № 3. - e00232.
14. Шумянцева В.В., Агафонова Л.Е., Булко Т.В., Королева П.И., Кузиков А.В., Масамрех Р.А., Филиппова Т.А., Новые высокочувствительные методы электроанализа каталитической активности ферментов, имеющих медицинскую значимость // *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. – 2024. – Т. 7. - № 3. - e00225.
15. Koroleva P.I., Kuzikov A.V., Gilep A.A. , Bulko T.V., Shumyantseva V.V., Electrochemical Assessment of CYP3A4 Catalytic Activity in Bactosomes // *BioNanoScience*. – 2024. – V. 14. – P. 2930-2939.

Материалы научных конференций

16. Королёва П.И., Бабкина С.С., Завьялова М.Г., Кузиков А.В., Шумянцева В.В., Электрокатализ цитохрома P450 3A4 для исследования межлекарственных взаимодействий // X юбилейная всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2020» 16-20 ноября 2020 г., Казань, Россия, С. 99.
17. Королёва П.И., Шумянцева В.В., Подходы к повышению эффективности электрокатализа цитохрома P450 3A4 // *Биотехнология: состояние и перспективы развития*, 26-29 октября 2021, Москва, Россия, С.144-146.
18. Королёва П.И., Цитохромы P450 как неинвазивные модели для исследования фермент-субстратного потенциала и межлекарственных взаимодействий // XVII Международная (XXVI Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых, 17 марта 2022 г., Москва, Россия, С.82
19. Королёва П.И., Шумянцева В.В., Повышение эффективности электрокатализа цитохромов P450 с помощью модификации электрода пространственно-упорядоченными наноструктурами // IV съезд аналитиков России, 26-30 сентября 2022 г., Москва, Россия, С.63
20. Королёва П.И., Шумянцева В.В., Повышение эффективности электрокатализа цитохромов P450 с помощью модификации электрода пространственно-упорядоченными наноструктурами // *Международный конгресс Биотехнология: состояние и перспективы развития*, 10 октября – 1 ноября 2022 г, Москва, Россия, С.63
21. Королёва П.И., Шумянцева В.В., Подходы к повышению эффективности электрокатализа цитохрома P450 3A4 // VI Международная научно-практическая конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (MOSM 2022), 7-11 ноября 2022 г., Екатеринбург, Россия, С.298
22. Королёва П.И., Шумянцева В.В., Повышение эффективности электрокатализа цитохромов P450 // *Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии»*, 24-27 апреля 2023 г., Санкт-Петербург, Россия, С.62

23. Королёва П.И., Шумянцева В.В., Подходы к повышению эффективности электрокатализа цитохрома P450 3A4 // Биотехнология: состояние и перспективы развития, 14 апреля 2023 г., Москва, Россия, С. 68-70
24. Королёва П.И., Шумянцева В.В., Электрокаталитические цитохром P450-системы: биосенсоры и биореакторы // XX Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, 4-8 сентября 2023 г., Владивосток, Россия, С.71
25. Королёва П.И., Шумянцева В.В., Цитохромы P450 как инструменты электроферментативного синтеза // XI Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2024», 12-17 мая 2024 г., С.72
26. Королёва П.И., Шумянцева В.В., Цитохромы P450 как инструменты электроферментативного синтеза // Всероссийская конференция с международным участием «Биомедицинская химия: наука и практика», 3-4 октября 2024 г., Москва, Россия, С.40
27. Королёва П.И., Шумянцева В.В., Электрокаталитические цитохром P450-системы: биосенсоры и биореакторы // Всероссийская научная конференция с международным участием «Биохимия человека 2024», 17-19 октября 2024 г., Москва, Россия, С.14

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ДДАБ – дидодецилдиметиламмоний бромид
 МЛВ – межлекарственные взаимодействия
 НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
 отн. – относительно
 ПГЭ – печатный графитовый электрод
 ФАД - флавинадениндинуклеотид
 ФМН – флавиномононуклеотид;
 ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
 [R] – концентрация субстрата (М)
 Ag/AgCl – хлорид серебряный электрод
 CHAPS - 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат
 CYP – цитохром P450
 CYP2C9 - цитохром P450 2C9
 CYP3A4 - цитохром P450 3A4
 CYP3A4BR – бактосомы, содержащие цитохром P450 3A4
 E^0 - полупотенциал пиков
 E_a – потенциал анодного пика
 E_c – потенциал катодного пика
 E_{cat} - потенциал восстановления в присутствии субстрата
 E_{red} – потенциал восстановления
 I_{cat} – каталитический ток (А)
 I_{catmax} – максимальный каталитический ток при насыщающей концентрации субстрата (А)
 I_{red} – ток восстановления цитохрома
 K_M – константа Михаэлиса; k_s – гетерогенная константа скорости переноса электронов
 m/z – отношение массы иона к заряду; SLO - стрептолизин O