

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО – ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
БИОМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ В.Н. ОРЕХОВИЧА (ИБМХ)**

*На правах рукописи*

Королёва Полина Игоревна

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

1.5.4. – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор

Шумянцева Виктория Васильевна

Москва – 2024

## Оглавление

Введение.....	4
Глава 1. Цитохромы P450 в биосенсорике и в биосинтетических приложениях.....	9
1.1. Характеристика цитохромов P450.....	9
1.2. Механизм функционирования цитохром P450-систем.....	10
1.3. Роль цитохромов P450 в межлекарственных взаимодействиях.....	15
1.4. Причины возникновения межлекарственных взаимодействий, метаболизируемых цитохромами P450.....	16
1.5. Методы исследования и регистрации межлекарственных взаимодействий .....	18
1.5.1. Исследование межлекарственных взаимодействий <i>in vivo</i> .....	18
1.5.2. Исследование межлекарственных взаимодействий <i>in vitro</i> .....	20
1.5.3. Исследование межлекарственных взаимодействий <i>in silico</i> .....	23
1.6. Перспективы цитохром P450-биореакторов.....	24
1.6.1 Сложности в создании цитохром P450-биореакторов и пути их преодоления на основе биохимических подходов .....	25
1.6.2. Физико-химические методы для создания биореакторов на основе цитохромов P450 ...	27
1.6.2.1. Фотовосстановление .....	28
1.6.2.2. Электрохимические методы анализа каталитической активности цитохромов P450 ...	29
1.6.3. Электрокатализ цитохромов P450 .....	30
1.6.3.1. Иммуобилизация микросом на электродах .....	33
1.7. Выводы.....	35
Глава 2. Материалы и методы.....	36
2.1. Реактивы.....	36
2.1.2. Препараты ферментов и белков.....	36
2.1.3. Бактосомы .....	36
2.2. Оборудование .....	37
2.3. Приготовление ферментных электродов .....	38
2.3.1. Приготовление ферментного электрода на основе цитохрома P450 3A4, модифицированного дидодецилдиметиламмоний бромидом.....	38
2.3.2. Приготовление электродов на основе цитохрома P450 3A4 и 2C9, модифицированных комплексами фермента с рибофлавином, флавиномононуклеотидом (ФМН), флавинадениндинуклеотидом (ФАД) .....	38
2.3.3. Приготовление ферментных электродов, модифицированных нанопористым оксидом алюминия (Anodisc) .....	38
2.3.4. Приготовление ферментных электродов, модифицированных стрептолизином O.....	39
2.3.5. Иммуобилизация бактосом на электроде.....	39
2.4. Электрохимические измерения.....	39
2.4.1. Электрохимические измерения в анаэробных условиях .....	39
2.4.2. Электрохимические измерения в аэробных условиях .....	40

2.5. Определение продуктов цитохром Р450-зависимых реакций .....	40
2.5.1. Определение N-деметилазной активности цитохрома Р450 3А4 по отношению к эритромицину .....	40
2.5.2. Исследование гидроксилазной активности цитохрома Р450 3А4, по отношению к диклофенаку .....	40
2.5.3. Исследование гидроксилазной активности цитохрома Р450 2С9 по отношению к диклофенаку .....	41
2.5.4. Спектрофотометрическое определение пероксида водорода, образующегося в ходе электрокаталитической реакции .....	41
Глава 3. Результаты и обсуждение .....	42
3.1. Электрохимические системы на основе цитохрома Р450 для моделирования межлекарственных взаимодействий.....	42
3.1.1. Многопараметричность электрохимического анализа цитохрома Р450 как инструмент в исследовании межлекарственных взаимодействий .....	42
3.1.2. Анализ каталитической активности рекомбинантного цитохрома Р450 3А4 для исследования межлекарственных взаимодействий препаратов, применяемых в комплексной терапии при лечении заболеваний ЖКТ, связанных с инфицированием <i>Helicobacter pylori</i> ....	44
3.1. Повышение эффективности электрокатализа электрохимических систем цитохрома Р450.....	50
3.2.1 Каталитический цикл цитохрома Р450 и образование продуктивного фермент-субстратного комплекса как первый шаг к повышению эффективности электрокаталитических процессов .....	50
3.2.2. Оптимизация электрон-транспортной цепи с помощью флавиновых кофакторов в качестве участников цепи переноса электронов на электроде .....	52
3.2.2.1. Флавины для увеличения эффективности электрокатализа цитохрома Р450 3А4 .....	53
3.2.2.2. Флавиновые кофакторы для повышения эффективности электрокатализа цитохрома Р450 2С9 .....	56
3.2.3. Переход от 2D к 3D режиму иммобилизации цитохромов Р450 для повышения эффективности электрокатализа.....	63
3.2.3.1. Использование нанопорowych ансамблей на основе нанопористого анодного оксида алюминия для иммобилизации цитохромов Р450.....	63
3.2.3.2. Использование мембранного порообразующего белка стрептолизина О для создания на электроде нанопорового ансамбля для иммобилизации цитохрома Р450 .....	68
Заключение .....	82
Выводы .....	84
Благодарности .....	85
Список использованных сокращений .....	86
Список использованной литературы.....	88
Приложение 1 .....	104
Приложение 2 .....	105

## **Введение**

### **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 [1]. Кроме того, эндогенные субстраты также подвергаются превращениям, катализируемым цитохромами P450. Например, под действием подсемейств цитохромов P450 4A, 4F и 4B жирные кислоты подвергаются  $\omega$ -окислению, альтернативному пути окисления жирных кислот в организме [2], изоформы цитохрома P450 2C8, 2C9, 3A4 и 1A1 участвуют в основном пути катаболизма *транс*-ретиноевой кислоты [3], цитохром P450 2D6 участвует в альтернативном пути биосинтеза серотонина в мозге [4].

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) [5].

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 [6]. 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<sup>®</sup> CYP450 Screening Kits от компании Thermo Fisher Scientific. При анализе с помощью таких наборов регистрируется флуоресценция продукта цитохром P450-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 цитохрому 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 [7].

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.

Для достижения цели были поставлены и решены 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 повышения выхода продуктов электроферментативных реакций цитохрома Р450 3А4 и Р450 2С9.

3. Оценить каталитическую эффективность цитохрома P450 3A4 при иммобилизации фермента в пространственно-упорядоченных наноструктурах на основе оксида алюминия, содержащих нанопоры.
4. Разработать электрохимическую систему иммобилизации цитохрома P450 3A4 на основе мембранного порообразующего белка стрептолизина O.
5. Проанализировать эффективность использования электрохимических систем при иммобилизации бактосом, содержащих цитохром P450 3A4, для повышения 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 повышения производительности биоэлектрохимической реакции. Впервые предложена схема модификации электрода мембранным порообразующим белком стрептолизином O 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 субстратных или ингибиторных свойств лекарственных препаратов в отношении изоформ цитохрома P450. Разработанные подходы повышения эффективности электрокатализа цитохромов P450 могут применяться для синтеза лекарственных веществ и синтетических производных стероидных гормонов.

## **Методология и методы исследования**

В диссертационной работе использованы электрохимические системы на основе цитохромов P450 (CYP3A4 и CYP2C9). Проведен анализ электрохимических параметров взаимодействия CYP3A4 с субстратами для оценки межлекарственных взаимодействий. Разработаны системы иммобилизации цитохромов P450, позволяющие увеличить эффективность электрокаталитических реакций. Для оценки эффективности цитохром P450-зависимых реакций, проводили 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.

## **Достоверность результатов**

Полученные в работе результаты являются достоверными, что подтверждается методами обработки экспериментальных данных и адекватным статистическим анализом данных.

Основные положения научной работы были представленным на X Юбилейной Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2020», (Казань, 2020), Международном конгрессе: Биотехнология: состояние и перспективы развития, (Москва, 2021), XVII Международной (XXVI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, (Москва, 2022), IV Съезде аналитиков России, (Москва, 2022); Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2022), «Молодежной школе по электроаналитической химии и биоанализу» в рамках VI Международной научно-практической конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов», (Екатеринбург, 2022), VIII Междисциплинарной конференции Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии, (Санкт-Петербург, 2023), «XX Всероссийской молодежной

школе-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).

### **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.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 27 работ, из них 15 статей в рецензируемых научных журналах, из них 5 в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ и 12 работ в сборниках тезисов конференций.

## Глава 1. Цитохромы P450 в биосенсорике и в биосинтетических приложениях

### 1.1. Характеристика цитохромов P450

Цитохромы P450 – обширное семейство ферментов, относящихся к классу оксидоредуктаз. Активный центр цитохрома P450 представляет собой гем типа b, ион железа которого ковалентно связан с апоферментом через атом серы остатка цистеина. Представители семейства цитохромов P450 распространены в бактериях, грибах, растениях, дрожжах, беспозвоночных и позвоночных животных. В организме млекопитающих цитохромы P450 экспрессируются в различных органах, наибольшая концентрация наблюдается в тканях печени, эпителии кишечника, мозга, легких, и почек. В человеческом организме выявлено 57 генов цитохрома P450, подразделяемых на 18 семейств и 43 подсемейства [1].

Отношение изофермента к семейству, которое определяется 1 цифрой в наименовании, характеризуется схожестью кодирующего его гена с другими генами, кодирующими ферменты данного подсемейства на 40%. При принадлежности к одному подсемейству, обозначаемое буквой, гомологичность генов составляет 55%. Последняя цифра в названии указывает на конкретный изофермент [8].

Открытие данного семейства ферментов происходило в несколько этапов. В 1958 году Мартин Клингенберг опубликовал работу [9], в которой описывал присутствие в микросомах печени неизвестного акцептора электронов, обладающего спектральной активностью в области длин волн 450 нм. Затем в 1962-1964 годах была опубликована серия работ [10-12] авторами Цунео Омурой и Рё Сато, в которых впервые упоминается название «P-450» и охарактеризован активный центр фермента, как гем типа b. Также авторы установили способность перехода изоформы P450 в P420 при обработке метилизоцианидом.

Функциональная значимость цитохромов P450 в организме млекопитающих, и в частности человека, двойственна. С одной стороны, это метаболизм эндогенных субстратов, например, CYP1A1, 2B6, 2C9, 3A4 играют важную роль в катаболизме эндогенных стероидов, таких как тестостерон, прогестерон, андростендион, кортизол и желчные кислоты, подвергая их реакции гидроксирования. CYP11A1, 17A1, 19A1, 21A2 участвуют в биосинтезе стероидных гормонов (прегненолон, прогестерон, андростендион, эстрон, тестостерон, эстрадиол, кортизол и альдостерон) и холестерина (CYP51) [13, 14]. Кроме того, цитохромы P450 участвуют в метаболизме витамина D3, арахидоновой кислоты, жирных кислот [15, 16]. Другим, крайне важным свойством цитохромов P450 является метаболизм экзогенных соединений: обезвреживание токсинов, биофлавоноидов,

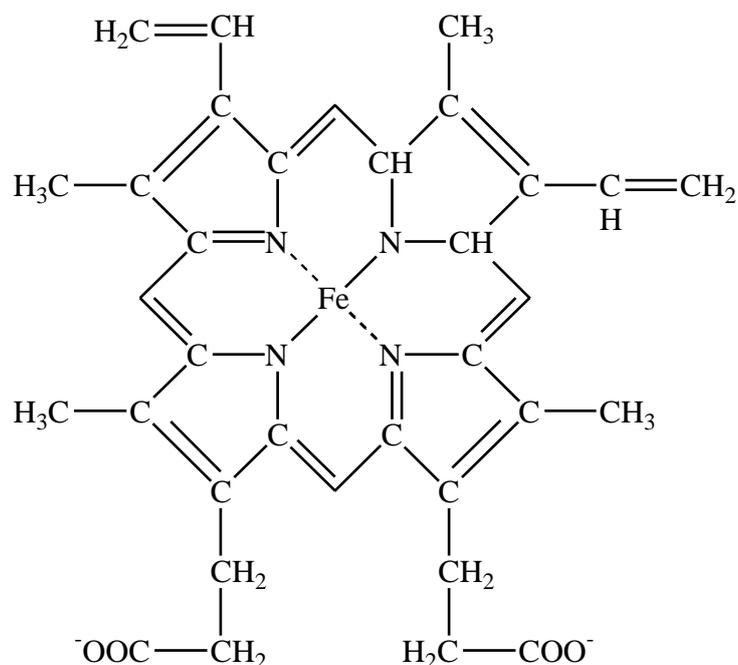
а также биотрансформация лекарственных средств. Наиболее экспрессируемые в организме человека CYP3A4, 2C9, 2E1, 1A2 участвуют в 90% реакций I фазы метаболических превращений всех применяемых лекарств [6, 17].

Цитохромы P450 катализируют стерео- и региоспецифичные реакции в отношении насыщенных и ненасыщенных углеводородов, ароматических соединений и стероидов. Под действием цитохромов P450 возможны следующие реакции: окисление спиртов, N-, O-, S-деалкилирование, расщепление насыщенной углерод-углеродной C-C и углерод-водородной C-H связей, с участием молекулярного кислорода при атмосферном давлении, приводящие к образованию более полярного, по сравнению с субстратом, продукта реакции, способствуя тем самым II фазе метаболизма с участием N-ацетилтрансферазы, глутатион-S-трансферазы, глюкуронозилтрансферазы, эпоксидгидролазы и метилтрансферазы [18]. Это приводит к большому разнообразию метаболических путей биотрансформации экзогенных и эндогенных соединений [19]. Окисление лекарственного препарата, осуществляемое при участии изоферментов цитохрома P450, может приводить к снижению, инаktivации или изменению его фармакологических свойств, или наоборот, повышать его фармакологическую активность. Например, изоформы CYP2D6 и CYP3A4 участвуют в метаболизме противоопухолевого препарата – тамоксифена и образовании эндоксифена, обладающего большей, по сравнению с тамоксифеном противоопухолевой активностью [20].

Благодаря разнообразию не только среди цитохромов P450, но и многообразию субстратов, метаболизируемых данными ферментами, а также типов катализируемых реакций, исследование каталитических свойств цитохромов P450 важно для решения медицинских и фармакологических задач. В связи с этим разработка систем для моделирования цитохром P450-зависимых путей биотрансформации и специфических химических реакций является актуальной задачей современной биотехнологии, биохимии, биоэлектрохимии, персонализированной медицины и энзимологии.

## **1.2. Механизм функционирования цитохром P450-систем**

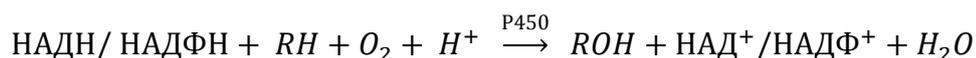
Все изоферменты цитохромов P450 содержат гем типа *b* - протопорфирин IX с координированным атомом железа (Рисунок 1). Несмотря на различия в аминокислотной последовательности представителей семейства цитохромов P450, общим является ковалентная связь иона железа  $Fe^{+3}$  с белком через атом серы остатка цистеина. Данный остаток является единственным консервативным аминокислотным остатком для всех цитохромов P450 [21].



**Рисунок 1.** Гем типа *b* – протетическая группа цитохромов P450. Ион железа в составе гема имеет переменную степень окисления ( $\text{Fe}^{+2/+3}$ ).

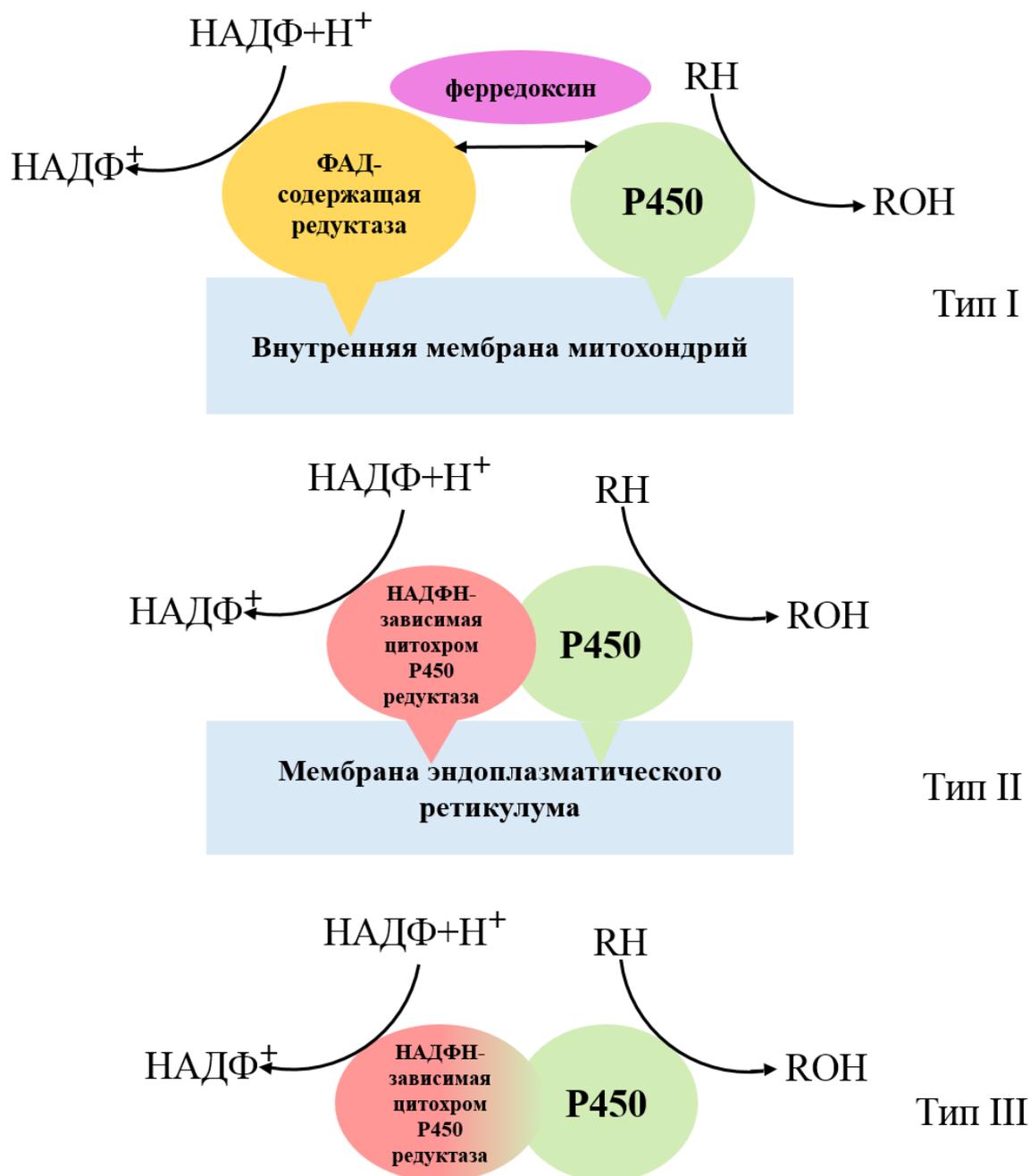
Именно образование высокоэнергетической связи между атомами серы и железа делает возможным протекание энергетически невыгодных реакций, например, таких, как активация C – H связи [22].

Особенностью каталитического механизма цитохромов P450 является бисубстратная схема с использованием двух субстратов – молекулярного кислорода и органической молекулы, при этом один из атомов кислорода присоединяется к молекуле субстрата, а другой протонируется с образованием воды (Схема 1).



**Схема 1.** Обобщенный механизм реакции, катализируемой цитохромом P450.

Для цитохромов P450 существуют различные варианты электрон-транспортной цепи [23-25], характерные для различных организмов или клеточной локализации. Для цитохромов P450 выделяют 10 классов электрон-транспортных систем. В более общем виде их можно классифицировать на три типа: митохондриальные, микросомальные и самодостаточные (рисунок 2) [26].



**Рисунок 2.** Структурная организация цитохром P450-систем [23-26].

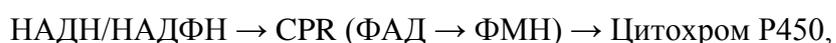
К первому типу относятся как некоторые бактериальные изоформы цитохрома P450, так и локализованные в митохондриях эукариот. Электрон-транспортная цепь таких цитохромов P450 состоит из трех отдельных белков: ФАД-содержащей редуктазы, переносящей восстановительные эквиваленты на ферредоксин, который передает восстановительные эквиваленты непосредственно на цитохром P450. В бактериальных системах все перечисленные белки растворимы, а в эукариотических клетках только ферредоксин является растворимым и локализован в матриксе митохондрий, а редуктаза и

цитохром P450 закреплены на внутренней мембране митохондрий. Примером цитохрома P450 млекопитающих митохондриального типа может служить семейство CYP11, локализованное в надпочечниках и отвечающее за биосинтез стероидных гормонов [27]. Примером бактериальных цитохромов P450 является фермент P450<sub>cam</sub>, относящийся к семейству CYP101 из *Pseudomonas putida*, отвечающих за биотрансформацию D-камфоры [28].

Второй тип электрон-транспортной цепи характерен для большинства изоформ цитохрома P450 эукариот, обладающих наибольшим разнообразием каталитических реакций. Микросомальная система состоит из двух белков, интегрально закрепленных на поверхности эндоплазматического ретикулума: НАДФН-зависимой цитохром P450 редуктазы (CPR) и цитохрома P450. Цитохром *b*<sub>5</sub> участвует в независимом от CPR переносе электронов от НАДН-зависимой цитохром *b*<sub>5</sub> редуктазы, а также в аллостерической регуляции цитохрома P450 [26].

Некоторые бактериальные цитохромы P450 принадлежат к самодостаточным ферментам. В таких системах белок редокс-партнер находится на одной полипептидной цепи с цитохромом P450. Для таких белков существуют различные комбинации доменов, участвующих в электрон-транспортной цепи цитохромов P450. Наиболее изученным из флавогемопротеинов является CYP102A1 (P450 BM3) из *Bacillus megaterium*, используемый в качестве модели эукариотических цитохромов P450 благодаря идентичной электрон-транспортной цепи, состоящей из флавопротеина НАДН(НАДФН)-зависимой цитохром P450 редуктазы (CPR) и гемопротеина цитохрома P450. В молекуле CYP102A1 гемовый домен цитохрома P450 связан через N-конец с CPR [29] (Рис.2).

Электронный транспорт в микросомальных системах происходит в соответствии со схемой:

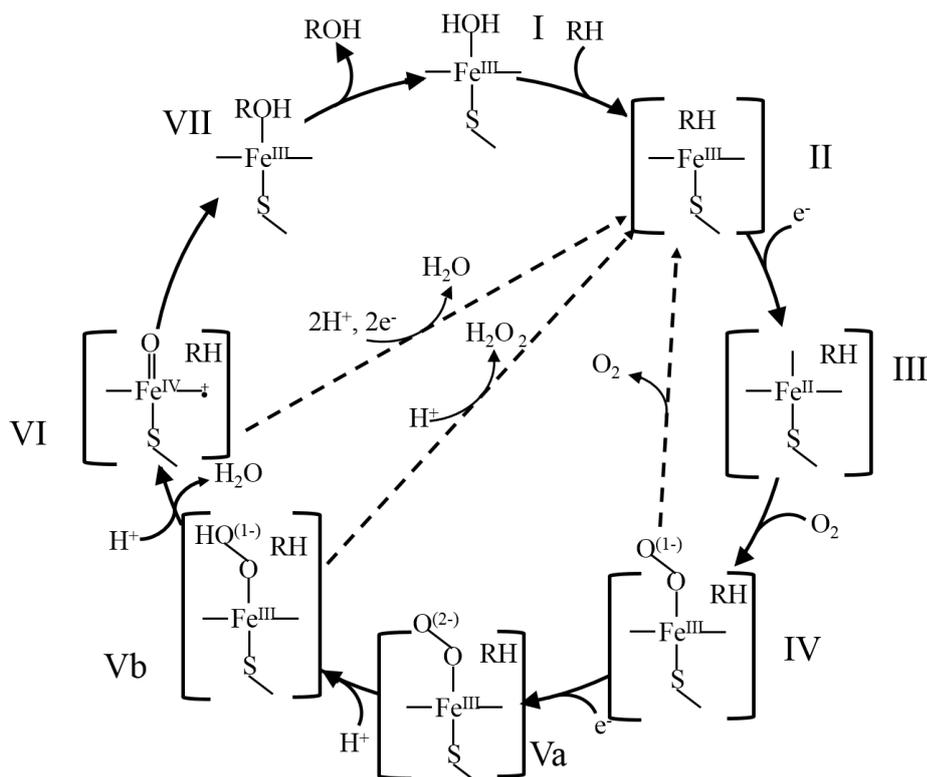


где ФАД – флавинадениндинуклеотид и ФМН – флавинмононуклеотид, входящие в состав флавопротеина CPR [23].

На рисунке 3 представлен каталитический цикл цитохрома P450 [15, 24, 30]. Впервые последовательное двухэлектронное восстановление цитохрома P450 и существование нескольких интермедиатов было открыто для бактериального цитохрома P450 101 (CYP101) [21-33] и микросомальных систем [34] в конце 60-х - начале 70-х годов. Связывание субстрата с ферментом в низко-спиновом Fe<sup>+3</sup> состоянии (I) приводит к образованию фермент-субстратного комплекса и изменению низко-спинового состояния (часто частично, и иногда вытеснению координированной воды из активного центра фермента) в высоко-спиновый субстрат-связывающий комплекс (II). Высоко-спиновый ион

$\text{Fe}^{+3}$  имеет более положительный потенциал восстановления и, таким образом ион железа гема активного центра цитохрома P450 принимает электрон и переходит в  $\text{Fe}^{+2}$  состояние (III) в соответствии со схемой  $\text{Fe}^{+3} + 1 e^- \rightarrow \text{Fe}^{+2}$ . Среди различных изоферментов цитохрома P450 возможны вариации в каталитическом цикле и сдвиг спина не всегда осуществляется [26].

Связывание кислорода приводит к образованию окси-P450 (IV), который является последним относительно устойчивым интермедиатом в этом цикле. Далее восстановление окси-P450 комплекса, последовательное образование пероксо- $\text{Fe}^{+3}$  интермедиата (Va), его протонирование в гидропероксо- $\text{Fe}^{+3}$  интермедиат (Vb), второе протонирование дистального атома кислорода с частичным гетеролизом O-O связи и образованием высоковалентной феррильной формы  $\text{Fe}^{+4}$  (VI) и воды, и оксигенация субстрата с формированием комплекса (VII) протекают при высокой скорости, без накопления промежуточных интермедиатов, что затрудняет кинетические исследования данного каскада реакций.



**Рисунок 3.** Каталитический цикл цитохрома P450 [6, 24, 30, 34, 35].

Первым этапом каталитического цикла цитохрома P450 является образование фермент-субстратного комплекса, и все последующие превращения происходят в фермент-субстратном комплексе [6, 24, 30, 34, 35]. В дополнение к нескольким отдельным промежуточным состояниям, каждое из которых имеет свои собственные уникальные

свойства, каталитический цикл цитохрома P450 содержит по меньшей мере три разветвляющиеся точки, где возможны дополнительные реакции [36].

Основными побочными путями каталитического цикла являются [30]:

- автоокисление окси –  $Fe^{+2}$  фермента (IV) с образованием супероксидного аниона и возвращения фермента к его основному состоянию (II);
- пероксидное направление, когда координированный пероксид или гидропероксидный анион (V a, b) отщепляются от иона железа, образуя пероксид водорода, таким образом завершая непродуктивное (с точки зрения превращения субстрата) двухэлектронное восстановление кислорода;
- оксидазное расщепление, где  $Fe^{+4}$ -оксоинтермедиат (VI) окисляется до воды вместо оксигенации субстрата, что приводит к четырехэлектронному восстановлению молекулы кислорода с последующим образованием двух молекул воды.

Неполная сопряженность каталитического цикла, т.е. нарушение стехиометрии реакции, является одним из затруднений, возникающем при катализе цитохромами P450. В результате перечисленных выше реакций накапливаются активные формы кислорода (АФК), которые могут повреждать активный центр, что приводит к самоинаktivации фермента, а также участвовать в реакциях неспецифического окисления субстрата [37].

В связи с широкой субстратной специфичностью, большим разнообразием катализируемых химических реакций и метаболической активностью по отношению к лекарственным препаратам разработка биосенсоров и биореакторов на основе цитохромов P450 представляет важную и перспективную задачу для фармакологии и персонализированной медицины (поиск новых субстратов и ингибиторов этого класса гемопротеинов в режиме биосенсорного анализа), для биотехнологии в режиме биореакторов (получение прекурсоров, сложных по строению и синтезу химических соединений), для медицины (анализ межлекарственных взаимодействий) [38-42].

### **1.3. Роль цитохромов P450 в межлекарственных взаимодействиях**

Межлекарственные взаимодействия – это взаимодействия лекарственных средств, которые могут возникать при приеме нескольких препаратов одновременно и вызывать нежелательные побочные эффекты. Межлекарственные взаимодействия можно разделить на фармакокинетические и фармакодинамические. Фармакокинетические взаимодействия происходят на этапах всасывания, биотрансформации, связывания с белками крови и выведения. Именно на этапе биотрансформации происходит метаболизм лекарственных веществ различными изоформами цитохрома P450. Фармакодинамические типы

взаимодействия описывают конечный результат данного взаимодействия: синергизм, антагонизм и индифференцию лекарственных веществ [43].

Введение нескольких лекарств может привести к отрицательным метаболическим взаимодействиям, когда один фермент отвечает за метаболизм более, чем одного препарата. Таким образом, под действием данного фермента могут возникать межлекарственные взаимодействия, обуславливающие развитие неблагоприятных побочных эффектов от проводимой комплексной лекарственной терапии.

Риск неблагоприятного взаимодействия лекарственных средств увеличивается с количеством вводимых лекарств. Одновременное введение нескольких лекарственных препаратов значительно повышает вероятность неблагоприятного взаимодействия, в том числе с участием цитохром Р450-зависимого метаболизма лекарственных препаратов. Способность цитохрома Р450 связываться и метаболизировать многочисленные клинически значимые препараты определяет большое количество межлекарственных взаимодействий. На такие взаимодействия с лекарственными средствами влияет ряд факторов, включая терапевтический индекс лекарств, относительные концентрации исходных препаратов, а также  $K_m$  (константа Михаэлиса) и  $K_D$  (константа диссоциации фермент-субстратного комплекса).

#### **1.4. Причины возникновения межлекарственных взаимодействий, метаболизируемых цитохромами Р450**

Взаимодействие лекарств – серьезная проблема, возникающая по нескольким причинам. Первая – это индукция ферментов, которые снижают биодоступность лекарств, при этом индуктором может быть лекарство, биодоступность которого снижается, либо другой лекарственный препарат. Индукция фермента — это увеличение экспрессии данного белка, по сравнению со скоростью экспрессии в отсутствие вещества индуктора, таким образом метаболизм лекарственного вещества, за который отвечает индуцируемый фермент, ускоряется, а концентрация активного вещества в крови снижается, и не оказывает желаемого эффекта. Например, снижение биодоступности орального контрацептива 17 $\alpha$ -этинилэстрадиола при лечении рифампицином, барбитуратами или зверобоем продырявленным (*Hypericum perforatum*), которые индуцируют СYP3A4 [44-46].

Вторая причина межлекарственных взаимодействий (МЛВ) - ингибирование цитохрома Р450. Ингибирование ферментов цитохромов Р450 может происходить по активному или же по аллостерическому центрам. Ингибирование активного центра ферментов можно разделить на обратимое и необратимое, при необратимом ингибировании фермент ковалентно связывается с молекулой ингибитора, что приводит к необратимой

инактивации фермента [47]. В обратимом ингибировании ферментативной активности можно выделить следующие типы: конкурентное, неконкурентное и смешанное.

В случае конкурентного ингибирования можно рассмотреть два примера, случай, когда ингибитор структурно схож с молекулой субстрата, однако не обладает группой, которая могла бы подвергаться ферментативному превращению, таким образом активный центр фермента оказывается заблокированным. Например, в случае CYP3A4-зависимого метаболизма антигистаминного препарата терфенадина конкурентным ингибитором будет кетоконазол [48]. Также можно рассмотреть ситуацию, когда ингибируется каталитическая активность фермента по отношению к субстрату, в случае присутствия другого субстрата, то есть два субстрата конкурируют за активный центр фермента. Так CYP3A4-зависимый метаболизм терфенадина замедляется субстратом CYP3A4 эритромицином [48].

При неконкурентном ингибировании взаимодействие ингибитора и фермента происходит не в активном центре фермента, а в аллостерическом центре связывания. Связываясь, ингибитор изменяет конформацию фермента, что делает невозможным дальнейшее превращение субстрата. Примером неконкурентного ингибитора CYP1B1 является 19-(R/S)-гидроксиэйкозотетраеновая кислота, в работе [49] изучили влияние энантиомеров 19-гидроксиэйкозотетраеновой кислоты на CYP1B1-зависимое O-деэтилирование 7-этоксирезорифина, показано, что S-изомер является более сильным ингибитором по сравнению с R-изомером 19-гидроксиэйкозотетраеновой кислоты.

Наиболее сложным для описания с точки зрения кинетики является смешанный тип ингибирования, в этом случае связывание происходит как в активном центре фермента, в случае цитохрома P450 с ионом железа гема, так и с аллостерическим участком. Свойства смешанного ингибитора проявляет антиангиогенный препарат апатиниб в отношении CYP3A2 и 3A4 [50].

Другой важный тип ингибирования - необратимый, когда окисление субстрата разрушает цитохром P450 [45, 46]. Например, инактивация CYP3A4 бергамоттином и другими флавоноидами в составе грейпфрутового сока [16, 17, 51–53]. В случае цитохромов P450 существует еще один вид необратимого ингибирования - суицидное ингибирование или ингибирование, основанное на механизме действия ингибитора («mechanism-based inhibition») [54]. К такому ингибированию приводят субстраты, которые метаболизируясь в активном центре цитохрома P450 образуют продукт, комплекс которого с активным центром фермента уже не может разрушиться. Примером такого ингибирования является действие макролидного антибиотика кларитромицина на CYP3A4 [55], антидепрессанта пароксетина на CYP2D6 [54]. Часто именно данный вид ингибирования приводит к выраженным токсическим эффектам, вплоть до гепатотоксичности [56].

В качестве третьей причины можно обозначить полиморфизм изоформ цитохромов P450, например, у изоформ CYP2C9, 2C19 и 2D6. Полиморфизм изоформ цитохрома P450 вызван вариациями в генах, кодирующих данный белок, что приводит к изменениям в полипептидной цепи, это может оказывать влияние на каталитическую активность цитохрома P450, снижая или увеличивая её, а в некоторых случаях приводя к полному отсутствию активности [57]. CYP2C9 имеет несколько полиморфных модификаций, в работе [58] авторы сравнили влияние маркерного субстрата S-варфарина на модификации CYP2C9, P450 2C9\*2, P450 2C9\*3. Результаты работы показали, что активность мутантных форм значительно снижается по сравнению с диким типом по отношению к S-варфарину.

Для изучения всех вышеперечисленных причин было разработано несколько подходов к изучению межлекарственных взаимодействий.

## **1.5. Методы исследования и регистрации межлекарственных взаимодействий**

### **1.5.1. Исследование межлекарственных взаимодействий *in vivo***

Исторически самым первым методом исследования преобразования лекарств были методы *in vivo*. Примером такого подхода можно назвать исследование взаимного влияния омепразола и кларитромицина, которое было проведено на добровольцах. Изменение концентраций омепразола и его метаболита 5-гидроксиомепразола измеряли в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Было показано, что в присутствии кларитромицина концентрация 5-гидроксиомепразола снижается на 60% по сравнению с приемом только омепразола [59].

Накопление лекарственного препарата в организме во время исследования, может приводить к тяжелым последствиям у участников испытаний, что приводит к исключению данного участника из дальнейшего исследования. В работе [60] проводилось исследование опосредованных CYP3A4 межлекарственных взаимодействий на здоровых добровольцах, при взаимодействии применяемого для лечения лейкоза ингибитора тирозинкиназ – мидостаурина. Для изучения влияния лекарственных средств на метаболизм мидостаурина, катализируемый CYP3A4, и его метаболитов, были выбраны ингибитор CYP3A4 – кетоконазол, индуктор – рифампицин, и субстрат - мидазолам.

В ряде исследований, клиренс мидазолама использовался в качестве параметра активности CYP3A4 в клинических испытаниях других лекарств, однако при таком подходе, могут возникать МВЛ и побочные эффекты. Поэтому, часто для мониторинга активности и изучения влияния лекарственных средств на CYP3A4 используют уровень метаболитов эндогенных субстратов, например, 4β-гидроксихолестерина или соотношение 6β-гидрокортизол/кортизол [61]. В работе [61] проводили сравнение различных

подходов к исследованию индукции CYP3A4 под действием рифампицина у испытуемых. Авторы сравнивали как изменяется клиренс мидазолама, уровень 4 $\beta$ -гидроксихолестерина в плазме крови, и уровень 6 $\beta$ -гидрооксикортизол в моче при приеме различных доз рифампицина. Показано, что наибольшая корреляция наблюдается между количеством мидазолама и уровнем 4 $\beta$ -гидроксихолестерина, однако через 2 недели, после прекращения приема рифампицина, уровень 4 $\beta$ -гидроксихолестерина не снижался до уровня зарегистрированного в начале исследования, до приема индуцирующего агента. Несмотря на положительную сторону в применении уровня 6 $\beta$ -гидрооксикортизола в виде неинвазивности теста, уровень кортизола может изменяться из-за различных внешних и внутренних факторов, что делает уровень 6 $\beta$ -гидрооксикортизола менее репрезентативным для оценки активности CYP3A4.

Соотношение 6 $\beta$ -гидрооксикортизола и кортизола в моче используется как маркер активности CYP3A4. В работе [62] проводили оценку влияния биологически активных веществ таурина и L-карнитина на активность CYP3A4, используя соотношение 6 $\beta$ -гидрооксикортизол/кортизол на добровольцах, принимавших таурин или L-карнитин на протяжении 14 дней. Образцы отбирались до начала приёма биологически активных веществ, а также после 3, 7, 10 и 14 дней приема. Исследование показало, что таурин увеличивает каталитическую активность CYP3A4, а L-карнитин не оказывает статистически значимого влияния.

Использование эндогенных биомаркеров значительно упрощает задачу анализа активности изоформ цитохрома P450, однако не для всех изоформ цитохрома P450 известны такие биомаркеры, это ставит сложную задачу перед современной метаболомикой. Как было сказано выше, для CYP2D6 характерна высокая степень полиморфизма, поэтому оценка его активности необходима не только для исследования МВЛ, но и для определения фенотипа CYP2D6 у пациента для адекватного подбора дозы лекарственных препаратов. В качестве эндогенных маркеров активности CYP2D6 известны следующие соединения: 5-метокси-N,N-диметилтриптамин [63], пинолин [64], прогестерон [65], анандамид [66]. Определение данного перечня метаболитов возможно только с помощью анализа крови пациента, что делает данный тест инвазивным. Для неинвазивного фенотипирования, в качестве маркера используется соотношение декстрометорфан/декстрорфан, определенное в моче [67]. Декстрометорфан является противокашлевым средством, однако также обладает психоактивными свойствами [68], что вносит дополнительные затруднения при фенотипировании детей, беременных и кормящих женщин, пожилых людей. В исследовании [69] авторы выполняли поиск эндогенного биомаркера активности CYP2D6 в моче, с этой целью были отобрано 189 добровольцев

среди детей от 6 до 15 лет, и проведен анализ активности CYP2D6 по соотношению декстрометорфан/декстрорфан с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ и флуоресцентной детекцией, кроме того образцы были проанализированы жидкостной хроматографией с квадрупольной времяпролетной масс-спектрометрией. С помощью математической обработки результатов, были отобраны метаболиты, соответствующие критерию корреляции с соотношением декстрометорфан/декстрорфан, а также присутствие в образце как до начала приема декстрометорфана, так и после. Среди метаболитов, полученных после ионизации положительными ионами, выделен метаболит с  $m/z$  444,3102, названный M1, однако авторам не удалось идентифицировать данное соединение ни по продуктам фрагментации, ни по собственному отношению масса/заряд. Несмотря на это, авторы провели исследование влияния ингибитора CYP2D6 флуоксетина на соотношения креатинин/соединение M1 и декстрометорфан/декстрорфан на взрослых добровольцах. При приеме флуоксетина соотношение декстрометорфан/декстрорфан возрастало в 218 раз, относительно начальных значений до приема флуоксетина, а соотношение креатинин/соединение M1 возрастало в 9,56 раз.

Недостатком исследований на добровольцах является невозможность оценить влияние отдельных изоферментов цитохрома P450 на метаболизм лекарственных препаратов, высокая стоимость и длительность исследования. Поэтому создание систем мониторинга межлекарственных взаимодействий *in vitro* является актуальной задачей, позволяющей оценить побочные эффект МЛВ без возможного риска для здоровья добровольцев.

## **1.5.2. Исследование межлекарственных взаимодействий *in vitro***

### **1.5.2.1. Исследование в реконструированных системах**

Создание реконструированных систем на основе цитохромов P450 требует наличия белков редокс партнеров, фосфолипидов, а также системы генерации НАДФН. Использование микросом для исследования МВЛ является способом упрощения данных систем.

Микросомы – это морфологически замкнутые везикулы, в которые превращается эндоплазматический ретикулум при гомогенизации ткани, в которых содержатся компоненты цитохром P450-монооксигеназной системы [70]. Микросомы печени используются как удобный источник фермента цитохрома P450 для анализа токсичности *in vitro* и разработки лекарств. Микросомы печени - лабораторно приготовленные субклеточные фракции мембраны печени, которые содержат метаболизирующие лекарства ферменты цитохромы P450 и их редокс-партнеров: CPR и цитохром *b5*.

На основе микросом были разработаны как реконструированные [71], так и электрохимические системы [7, 72]. Среди преимуществ использования микросом выделяют наличие белков редокс партнёров непосредственно в микросомальной фракции и сохранение нативной конформации фермента.

В работе [71] авторы с помощью реконструированной системы на основе тканей печени доноров исследовали взаимодействие между лекарствами, используемыми в качестве противоопухолевых препаратов в терапии рака, гефетинибом и эрлотинибом и лекарствами, ингибирующими цитохромы P450, флуоксетином и лозартаном. В ходе исследования авторы показали, что гефетиниб и эрлотиниб метаболизируются микросомами с образованием трех метаболитов, а также, что за метаболизм гефетиниба и эрлотиниба ответственны следующие изоформы CYP3A4, 2D6, 1A2, 2C9, и 2C19. Было исследовано влияние всех возможных комбинаций перечисленных выше лекарственных препаратов на активность цитохромов P450 по уменьшению концентрации продукта. Так на метаболизм гефетиниба не оказывало значительное влияние присутствие флуоксетина или лозартана, но при комбинации трех лекарств наблюдалось значительное снижение активности перечисленных выше изоформ цитохромов P450. Схожая ситуация наблюдалась и при метаболизме лозартана, добавление гефетиниба или эрлотиниба не изменяло активности, но добавление к ним флуоксетина снижало активность. Только на метаболизм эрлотиниба не оказывало значительного влияния ни одно исследованное лекарство или их комбинация, но сам эрлотиниб вероятно обладает ингибирующим эффектом на метаболизм флуоксетина. Авторы подчеркнули, что необходимо с осторожностью применять данную комбинацию.

Еще одним примером создания системы, основанной на микросомах печени человека может служить работа [73], в которой авторы исследовали влияние алкалоидов растения кратом (*Mitragyna speciosa*), обладающих стимулирующим действием на организм, на ряд изоформ цитохромов P450. Было исследовано ингибирование активности CYP1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 и 3A5 по отношению к их маркерным субстратам. Показано, что алкалоиды митрагинин и коринантеидин обладают наибольшим ингибиторным эффектом на изоформу CYP2D6.

С помощью микросомальной фракции, полученной из печени человека, был исследован антиагрегантный препарат, прошедший вторую фазу клинических испытаний, викагрел на предмет возникновения межлекарственных взаимодействий [74]. Было исследовано ингибирование викагрелом ряда CYP2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, и 3A4. Авторы оценили изменение активности данного ряда цитохромов P450 под действием викагрела по

отношению к их маркерным субстратам, было показано, что наибольшее снижение активности происходит у CYP2B6 и 2C19.

### 1.5.2.2 Исследование в электрохимических системах

Наибольшие перспективы для исследования активности цитохрома P450 представляют электрохимические системы, где донором электронов служит электрод. Такой подход позволяет исключить использование редокс партнеров, а модификация поверхности электродов обеспечивает мембраноподобное окружение для цитохрома P450[75].

Оценку эффективности метаболизма лекарственных препаратов можно проводить по константе Михаэлиса ( $K_M$ ), авторами [76] разработана электрохимическая система, позволившая быстро и эффективно определить  $K_M$  ряда субстратов для CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9.

Иммобилизованный на стеклоуглеродном электроде CYP2A6, был исследован, для оценки CYP2A6-зависимого метаболизма компонентов табачного дыма никотина и кумарина, при действии ингибитора CYP2A6 антидепрессанта транилципромина, применяемого для лечения никотиновой зависимости [77]. Авторы получили значения  $IC_{50}$  транилципромина для CYP2A6-зависимого 7-гидроксилирования кумарина равное  $3,1 \pm 0,6$  мкМ, и 5'-окисления никотина равное  $3,7 \pm 0,2$  мкМ.

Изучение межлекарственных взаимодействий в электрохимической системе [78] проводили на примере субстрата CYP3A4 эритромицина – макролидного антибиотика, и ряда ингибиторов данной изоформы: кетоконазола, циметидина и диклофенака. Авторы показали снижение активности по отношению к эритромицину в случае всех трех ингибиторов, а для диклофенака был исследован тройной комплекс с хинидином, в этом случае активность по отношению к эритромицину снижалась в большей степени.

В работе [79] авторы использовали несколько подходов для исследования возможного межлекарственного взаимодействия между эритромицином и абиратероном при метаболизме CYP3A4. Для этого они оценили связывание абиратерона с CYP3A4 с помощью дифференциальной спектроскопии. Данные эксперименты показали, что по характеру изменения дифференциального спектра второго типа, абиратерон является ингибитором CYP3A4. Также было исследовано влияние абиратерона на CYP3A4-зависимый метаболизм эритромицина в электрохимической системе: абиратерон снижает активность CYP3A4 по отношению к эритромицину. Помимо этого, авторами была представлена модель связывания абиратерона с активным центром CYP3A4, и показано, что молекула фермента может связывать более чем одну молекулу субстрата.

Также влияние абиратерона и его метаболита D4A на CYP2C9 было исследовано по изменению эффективности CYP2C9-зависимого превращения напроксена [80]. Снижение скорости O-деметилирования 100 мкМ напроксена в электрохимической системе позволило оценить IC<sub>50</sub> для абиратерона 13,9 мкМ, его метаболита D4A 40 мкМ, и другого ингибитора CYP2C9 сульфafenазола 41 мкМ.

В вышеописанных работах авторы говорят о кооперативных свойствах цитохрома P450, что вносит дополнительные трудности в анализ ферментативной кинетики.

### 1.5.3. Исследование межлекарственных взаимодействий *in silico*

Благодаря тому, что были получены кристаллические структуры цитохромов P450 [81] стало возможным построение компьютерных моделей взаимодействия ферментов и субстратов. Методы *in silico* позволяют получить данные о связывании и конформационных особенностях взаимодействия активного центра фермента и субстрата или ингибитора, а также о связывании эффекторов с аллостерическим центром.

Среди наиболее часто применяемых подходов для создания моделей с целью предсказания межлекарственных взаимодействий являются: белково-лигандный докинг, модели взаимоотношения структура-активность (SAR), фармакофорное моделирование и метод молекулярной динамики [82]. Основная цель программ для моделирования - это предсказание свойств молекул для оценки перспективности их использования, однако, они нашли применение в исследовании межлекарственных взаимодействий.

Помимо оценки вероятности межлекарственного взаимодействия, с помощью методов *in silico* существует возможность моделирования расположения молекул лигандов (субстратов, ингибиторов) в активном центре фермента, для оценки типа взаимодействия и прочности образовавшегося комплекса. В работе [79] авторы провели докинг молекулы абиратерона и CYP3A4, и подтвердили результаты спектральных экспериментов, показывающих, что противоопухолевый препарат абиратерон связывается с CYP3A4 по второму типу связывания, а также то, что активный центр фермента может присоединять более чем одну молекулу абиратерона. Помимо этого, авторы оценили возможность межлекарственного взаимодействия между абиратероном и эритромицином с помощью системы операционной классификации (ORCA) [83] как Класс 2, то есть такая комбинация условно противопоказана.

Молекулярное моделирование и молекулярный докинг могут быть эффективными инструментами в поиске новых лекарственных соединений. Например, в работе [84] было проанализировано взаимодействие ряда производных 1,4-дигидропиридина, являющихся перспективными блокаторами кальциевых каналов. Используя структуру цитохрома

CYP3A4, полученную рентгеновской кристаллографией, доступную в PDB и кристаллические структуры уже полученных соединений и структурные формулы еще не доступных соединений, были рассчитаны энергии связывания различных ориентаций и определены расположения производных 1,4-дигидропиридина в активном центре фермента.

Компьютерные технологии являются эффективным поисковым инструментом для предсказания возможных межлекарственных взаимодействий, однако не могут служить доказательством такого взаимодействия, и, как правило, требуют экспериментального подтверждения.

### **1.6. Перспективы цитохром P450-биореакторов**

Функциональная значимость цитохромов P450 делает их универсальными природными катализаторами, обладающими следующими свойствами: функциональное разнообразие; введение функциональных групп в молекулы насыщенных углеводов, метаболические превращения с высокой регио- и стереоспецифичностью.

Для изоферментов цитохрома P450 нехарактерна высокая субстратная специфичность, при этом субстраты одной изоформы могут относиться к различным классам химических соединений, и обладать различными функциональными группами. Также при ферментативном превращении в организме, один субстрат может метаболизироваться несколькими изоформами цитохромов P450 и образовывать различные метаболиты. Это дает цитохромам P450 преимущество как ферментам для создания биореакторов.

При использовании в биотехнологических целях растительных цитохромов P450, могут быть получены соединения, найденные в растениях, обладающие биологической активностью [85]. Так, обнаруженные в коре тихоокеанского тиса (*Taxus brevifolia*) и родственных ему растений, соединения таксановые дитерпеноиды (таксоиды), и в частности таксол (паклитаксел) и полусинтетический аналог таксотер (доцетаксел), обладающие противоопухолевой активностью и применяемые для лечения злокачественных опухолей, могут быть получены путем биосинтеза [86]. Биосинтез таксоидов включает в себя множество стадий, одна из которых цитохром P450 – зависимое гидроксирование в восьми положениях [85]. В растительных клетках цитохромы P450 играют важную роль в образовании терпеновых алкалоидов [86], биологически активных веществ, проявляющих фармакологическую активность, например, противоопухолевые винкристин и винбластин, антигипертензивные резерпин и аймалицин, антиаритмический аймалин [85].

Существуют также случаи промышленного применения бактериальных цитохромов P450 для производства лекарственных препаратов. Например, правастатин, ингибитор 3 $\beta$ -гидрокси-3-метилглутарил-КоА (HMG-CoA) редуктазы, фермента, лимитирующего скорость образования холестерина в организме, получают из компактина 6 $\beta$ -гидроксилированием под действием CYP105A3 (P450sca2) из бактерий *Streptomyces carbophilus*. Технологии получения компактина и правастатина были открыты и изучены японской компанией Sankyo Co., Ltd (в настоящее время Daiichi Sankyo) [5]. Биореакторы разработанные Daiichi Sankyo работают с использованием дополнительных НАДФН-зависимых белков редокс-партнеров, дополнительная ферментативная система поддерживает уровень НАДФН постоянным [38, 88-90]

### **1.6.1 Сложности в создании цитохром P450-биореакторов и пути их преодоления на основе биохимических подходов**

Биотехнологическое применение цитохромов P450 в качестве биореакторов перспективная область, для развития которой необходимо преодолеть ряд ограничений [38, 40, 91-94]. Каталитический цикл цитохрома P450 характеризуется сложностью и многостадийностью. Для протекания ферментативной реакции, катализируемой цитохромом P450, необходим возобновляемый источник электронов – кофактор НАДФН, а также белки редокс партнеры НАДФН-зависимая цитохром P450 редуктаза (CPR) и цитохром b<sub>5</sub>.

Сложный каталитический цикл цитохрома P450 и образующийся стабильный фермент-субстратный комплекс приводят к тому, что скорость ферментативной цитохром P450-зависимой реакции, ниже относительно реакций, протекающих под действием ферментов других классов [91]. Кроме того, как было сказано выше, для протекания монооксигеназной реакции необходима передача электронов от редокс партнеров к активному центру цитохрома P450, в таком случае малоэффективная электрон-транспортная цепь будет приводить к снижению скорости ферментативной реакции. Эффективность белок-белкового взаимодействия, также может лимитировать передачу электронов к иону железа гема активного центра цитохрома P450. Данное ограничение успешно обходят бактериальные флавогемопротеины (разд. 1.2, рис. 2), объединяющие редуктазный и гемовый домены на одной полипептидной цепи, как, например, наиболее изученный, обнаруженный в *Bacillus megaterium*, CYP102A1 (BM3) [94, 95]. В работе [96] была разработана система для экспрессии слитной конструкции объединившей редуктазный и гемовый домены. Авторами были получены два модифицированных белка, один из которых объединял гемовый домен CYP102A1 и флаводоксин из *Desulfovibrio*

*vulgaris*, что улучшило электрохимические свойства белка на электроде, сделав активный центр более доступным для переноса электронов. Второй слитый белок состоял из комбинации N-конца полипептидной цепи CYP102A1, домена CYP2E1, связывающего гем и редуктазного домена CYP102A1, такая модификация позволила получить самодостаточный растворимый белок.

Как было показано в разделе 1.2 (рис. 3) каталитический цикл цитохрома P450 характеризуется разобщением между процессами окисления НАДН или НАДФН и образованием продукта, в таком случае образуются и накапливаются АФК, приводящие к инактивации как активного центра фермента, так и повреждению полипептидной цепи.

При использовании бактериальных систем, экспрессирующих необходимую изоформу цитохрома P450, а также белки редокс-партнеры, исчезает проблема регенерации кофактора, однако прохождение субстрата во внутрь клетки, так и выход продукта, через клеточную стенку может быть затруднен [38].

Кроме монооксигеназной активности у цитохромов P450, существует также пероксидазная и пероксигеназная активности [37]. Данный факт дает дополнительное преимущество при создании биореакторов. При протекании пероксигеназной реакции катализируемой цитохромом P450, механизм реакции заключается в преобразовании соединения II в соединение VI под действием пероксида (рис. 3), и последующим превращением субстрата, который в данном случае выступает донором электронов. Таким образом многостадийный каталитический цикл монооксигеназной реакции сокращается до четырех стадий [37]. Разнообразные пероксиды и пероксокислоты могут выступать в качестве окислителей, например, пероксид водорода,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -диметилбензил гидропероксид, трет-бутилгидропероксид, а также гидропероксиды жирных кислот. Пероксид-зависимые реакции могут вызывать необратимую инактивацию цитохрома P450 и снижать стабильность системы [39, 97-102].

Пероксигеназные реакции были реализованы на изоформах цитохромов P450 бактерий, поскольку они более стабильны по сравнению с изоформами других организмов [36, 102, 103]. Авторы модифицировали цитохром P450<sub>BSB</sub> из *Bacillus subtilis*, способный гидроксिलировать миристиновую кислоту, для получения изоформы с большей региоселективностью к  $\beta$ -положению жирных кислот в реакциях под действием пероксида водорода [103]. Продукты такого метаболического превращения представляют большой интерес вследствие их биологической активности. В качестве способа получения биотоплива было предложено цитохром P450-зависимое декарбоксилирование жирных кислот. Авторы статьи [104] показали, что такую реакцию катализирует изофермент OleT семейства CYP152, с образованием алкенов с двойной связью в C-1 положении.

Работа цитохромов P450 в режиме биореакторов реализована реконструированных системах [105-106]. Локализация CYP1A1 и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы, выполняющей функцию регенерации НАДФН, с помощью ковалентной иммобилизации на золотых наночастицах в замкнутое пространство мембраны пористого оксида алюминия была осуществлена в работе [107]. Такое последовательное проведение реакций в ограниченном пространстве, позволило ускорить работу обоих ферментов по сравнению с реакцией в растворе, каталитическая константа превращения 7-этоксирезорфуфина в резорифин под действием CYP1A1 увеличилась в 11 раз. В работе [108] авторы также создали реконструированную систему используя микросомы печени человека и крысы, ковалентно иммобилизовав их на поверхности магнитных бусин. Активность изоформ CYP2C9, 2D6 и 3A4, содержащихся в микросомах, определяли по цитохром P450-зависимому превращению диклофенака, буфуралола и альбендазола в качестве субстратов, соответственно. В дополнение разработали реконструированную систему, где глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, также была иммобилизована на магнитных бусинах. Данный подход позволил не только увеличить каталитическую эффективность системы, но также обеспечил операционную стабильность в течении трех циклов [108]. Использование микросом печени крысы и человека имеет этические проблемы, а также затруднения с воспроизводимостью каталитических параметров, в микросомальных фракциях невозможно получить единственную изоформу цитохрома P450. Поэтому такой подход не может рассматриваться, как эффективный и надежный метод создания биосенсоров и биореакторов.

Для функционализации полициклических ароматических углеводов (ПАУ) и их N- и O- содержащих производных использовали CYP3A4, как фермент с широкой субстратной специфичностью [109, 110]. В качестве биокатализаторов был использован штамм дрожжей *Komagataella phaffii*, экспрессирующих CYP3A4. Целью работы, было получение в препаративных количествах функционализированных ПАУ, что было реализовано на производных флуорена, флуореноле и флуореноне [111]. Авторам удалось масштабировать реакцию до объема 6 литров и получить выход 47,6 % для флуоренола и 9,7 % для флуоренона.

### **1.6.2. Физико-химические методы для создания биореакторов на основе цитохромов P450**

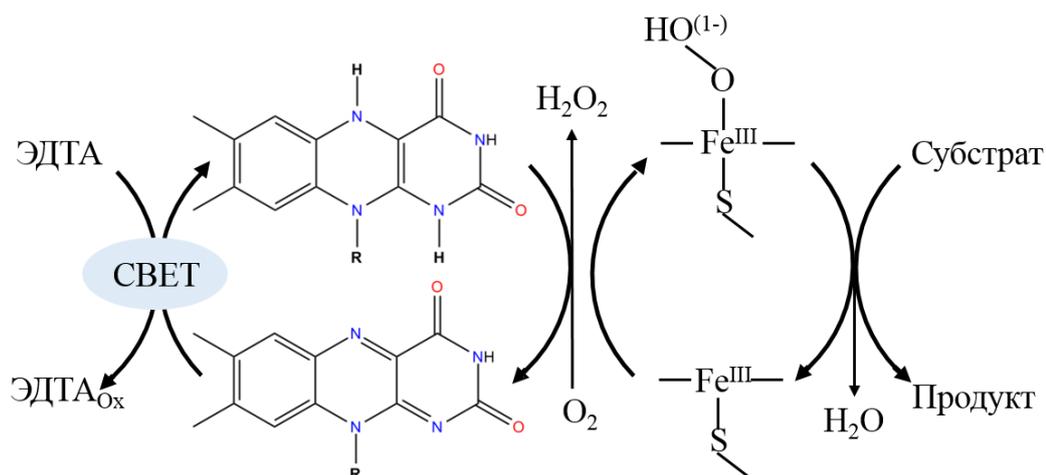
Использование в качестве биореакторов реконструированных систем, содержащих флавопротеин и гемопропротеин, не является оптимальным по причине необходимости использования белков редокс-партнеров и доноров электронов. Поэтому применение

физико-химических методов с альтернативными источниками электронов крайне актуально. Среди таких подходов для создания биореакторов можно выделить фотовосстановление и электровосстановление.

#### **1.6.2.1. Фотовосстановление**

Фотосенсибилизирующие вещества при облучении видимым светом могут восстанавливаться и передавать восстановительные эквиваленты на ион железа гема цитохрома Р450, что делает данные вещества альтернативой для создания биореакторов [112]. Для работы таких систем, помимо фотосенсибилизирующего вещества для протекания фотохимической реакции восстановления цитохрома Р450, необходимы также первичный источник электронов и источник излучения. В качестве фотосенсибилизирующих материалов могут выступать различные окрашенные вещества, поглощающие видимый свет в диапазоне от 400 до 700 нм, например, флавиновые соединения (рибофлавин, ФАД, ФМН), органические красители (бенгальский розовый, конго красный, эозин Y, флуоресцеин), комплексы металлов (полипиридиновый комплекс рутения, протопорфирин цинка) [113].

При возбуждении светом фотосенсибилизаторов и получении восстановительных эквивалентов от первичного донора, инициация каталитического процесса может протекать по двум путям, первый — это восстановление кислорода с генерацией пероксида водорода, и дальнейшей активацией активного центра цитохрома Р450 по пероксидазному шунту [114], второй путь — это непосредственный перенос электронов от восстановленного фотосенсибилизатора на ион железа гема цитохрома Р450. На рисунке 4 представлена схема фотовозбуждения флавинового соединения в присутствии ЭДТА в качестве первичного источника электронов, с дальнейшей генерацией пероксида водорода либо непосредственным восстановлением цитохрома Р450 [114].



**Рисунок. 4.** Схема каталитического превращения субстрата цитохромом P450 под действием света на фотосенсибилизирующие вещества.

Описанный выше подход был реализован в работе [114], авторы исследовали CYP102A1-зависимое каталитическое превращение лауриновой кислоты и 4-нитрофенола. Для протекания реакции под действием света, реакционную смесь из растворов ФМН, ЭДТА, CYP102A1 и субстрата, помещали в 96-луночный планшет и облучали светом видимого спектра на протяжении 5 часов. Авторы регистрировали образование продукта в смеси, после проведения реакции, кроме того при добавлении каталазы, выход продукта существенно снижался, что свидетельствует о протекании реакции по пероксидазному механизму.

Также исследовано фотовосстановление цитохромов P450 включенных в бактериальные клетки [115]. Показано, что при добавлении красителя эозина Y в систему, он накапливается в цитоплазмах клеток, кроме того авторы показали, что молекула эозина Y связывается непосредственно с активным центром цитохрома P450. Для протекания реакции фотовосстановления в качестве первичного источника электронов использовали триэтаноламин. Была исследована активность мутантных форм цитохрома P450 BM3 в отношении конверсии 7-этоксикумарина в 7-гидроксикумарин, а также цитохрома P450 3A4 в отношении омепразола, ловастатина, симвастатина, и CYP1A1 и 1B1 в отношении 17β-эстрадиола. Фотовосстановление показало свою эффективность во всех исследованных системах.

#### 1.6.2.2. Электрохимические методы анализа каталитической активности цитохромов P450

Совмещение электрохимии и ферментативного катализа, путем иммобилизации фермента на электроде впервые предложено советскими учеными И.В. Березиным и С.Д.

Варфоломеевым в 1979 году [116, 117]. Впервые восстановление цитохрома P450 на электроде было исследовано Арчаковым, в 1981 году [118].

Основным преимуществом электрохимических систем является непосредственный перенос электронов на активный центр фермента с поверхности электрода. Кроме того, процесс восстановления фермента на электроде обладает количественными параметрами, используя которые можно оценить кинетические и каталитические характеристики фермента [119]. Имобилизация показала себя как наиболее эффективная методика работы в цитохром P450-электрохимических системах. Применение различных модификаторов, позволяет улучшать характеристики системы, такие как электропроводность и скорость переноса электронов, а также сохранять нативную конформацию и каталитические свойства фермента [7, 119, 120]. Кроме того, электрохимические системы цитохрома P450 показали себя как эффективные биосенсоры, позволяющие оценивать субстратные и ингибиторные свойства лекарственных препаратов, а также обнаружения токсических веществ в растворах (биологические жидкости, сточные воды) [121-123].

### 1.6.3. Электрокатализ цитохромов P450

Процессы восстановления и окисления цитохрома P450 на поверхности электрода протекают в тонкой пленке белка (сорбционный режим), что подтверждается линейной зависимостью амплитуды анодного и катодного токов от скорости сканирования [75, 119, 124]. Для получения кинетических характеристик функционирования фермента, необходимо оценить количество электроактивного белка на поверхности электрода, что, возможно благодаря количественным характеристикам присущим электрохимическим измерениям [7, 119, 124].

В микросомальных системах перенос электронов к активному центру цитохромов P450 от донора электронов НАДФН происходит в соответствии со схемой НАДН/НАДФН → ФАД → ФМН → Цитохром P450 [125], при этом ФАД и ФМН являются простетическими группами CPR. В ряде работ были разработаны различные подходы, имитирующие микросомальную электрон-транспортную схему, за счет включения в структуру цитохрома P450 редуктазных доменов или флавиновых кофакторов [58, 112, 125].

В ряде работ группы Дж. Джиларди (G. Gilardi) использовался подход создания слитых белков, называемый авторами «молекулярным Лего» (molecular Lego) [97]. В таких конструкциях с помощью генной инженерии к домену цитохрома P450 человека, присоединяли домен флаводоксина (FLD) бактерии *Desulfovibrio vulgaris*, или редуктазный домен CYP102A1 бактерии *Bacillus megaterium* (BMR) [126]. Такой выбор обусловлен

сходством между полипептидной последовательностью FLD и BMR с доменом CPR, связывающем ФМН. Такие слитые конструкции получены для изоформ цитохрома P450 2E1 [97], 2C9 [58], 3A4 [126], 2E6 [77]

Использование данного подхода к усовершенствованию электрон-транспортного пути цитохромов P450, оценивалось по характеристикам, проявляемым в электрохимических системах. В работе [126] авторы сравнили такие параметры как скорость переноса электронов  $k_s$ , эффективность катализа, по количеству продукта реакции, и сопряженность реакции для CYP3A4, CYP3A4-FLD и CYP3A4-BMR. Так для скорости переноса электронов не наблюдалось улучшений при переходе от CYP3A4 к CYP3A4-FLD и CYP3A4-BMR, а количество образовавшегося в ходе CYP3A4-зависимого превращения эритромицина формальдегида существенно возрастало с  $1,4 \pm 0,2$  до  $3,3 \pm 0,6$  и  $5,4 \pm 1,4$  мкМ формальдегида/пмоль белка для CYP3A4, CYP3A4-BMR и CYP3A4-FLD, соответственно. Также, увеличивалась сопряженность реакции, с  $0,9 \pm 0,3$  % для CYP3A4,  $5,1 \pm 1,5$ % для CYP3A4-FLD и  $2,1 \pm 0,5$ % для CYP3A4-BMR. В системах с CYP2C9 и CYP2C9-FLD, иммобилизованных на стеклоуглеродном электроде, модифицированном дидодецилдиметиаммоний бромидом (ДДАБ), в случае CYP2C9-FLD наблюдается более эффективное каталитическое превращение S-варфарина кратное 4 [58].

Поскольку, как отмечалось ранее, процесс восстановления цитохрома P450 на электроде, является поверхностно-контролируемым процессом существует необходимость иммобилизации гемопroteина на поверхности рабочего электрода. Для используемых в биоэлектрохимии электродов характерна плоская рабочая поверхность, однако при взаимодействии белка с такой «твердой» поверхностью [128], может происходить изменение третичной структуры, что влияет на каталитические свойства фермента. Поэтому для модификации электродов с последующей иммобилизацией цитохрома P450 были предложены методики с использованием пористых материалов, например, индий, допированный оксидом олова (ИТО), оксид титана, оксид алюминия, мезопористый графен, мезопористый оксид кремния [107, 121, 128-132]. Использование нанопористых покрытий для иммобилизации ферментов приводит к упорядочиванию молекул белка на поверхности электрода, что подтверждается возрастающей эффективностью протекания электрокаталитических реакций [130-132]. Для материалов, применяемых в качестве нанопористых необходимо соответствовать следующим характеристикам: биосовместимость, инертность, электропроводность. Также проведение реакций в нанопорах, наноканалах, мицеллах, создает благоприятное окружение фермента, приближенное к биологическим системам [133].

Проводили изучение свойств иммобилизованного СУР3А4 на поверхности золотого дискового электрода, подвергнутого процедуре анодирования, с образованием развитой структуры из углублений 20 нм, дополнительно модифицированного нафталинтиолом [129]. Авторы наблюдали симметричные окислительный и восстановительный пики СУР3А4 в анаэробных условиях с полупотенциалом  $E^{0'} = -0,34$  В, а также каталитический ток в присутствии тестостерона.

Для бактериального цитохрома Р450 ВМ3 была разработана электрохимическая система на основе стеклоглеродного электрода (СУЭ), где для иммобилизации фермента использованы наночастицы кремния с разветвленными порами (ДМКН), модифицированные -ОН или -NH<sub>2</sub> группами [130]. При этом для закрепления наночастиц с иммобилизованным цитохромом Р450 ВМ3 использовали хитозан. Авторы утверждают, что уменьшение константы скорости переноса электронов  $k_s$  в их системах Р450 ВМ3/ОН-ДМКН/СУЭ  $k_s = 5,56$  с<sup>-1</sup>, Р450 ВМ3/NH<sub>2</sub>-ДМКН/СУЭ  $k_s = 3,10$  с<sup>-1</sup>, относительно других систем, предложенных в литературе, например, по сравнению с Р450 ВМ3 дикого типа, иммобилизованного на плоском графитовом электроде, модифицированном додецил сульфатом натрия  $k_s = 10$  с<sup>-1</sup> [131], свидетельствует о меньшем разобщении электродного процесса. Наблюдались различия в свойствах систем, модифицированных наночастицами кремния с разветвленными порами, содержащими гидроксильные или аминогруппы. При модификации -NH<sub>2</sub> группами, заряженными положительно в условиях проведения эксперимента, молекулы фермента ориентировались отрицательно заряженным доменом редуктазы к поверхности кремниевой наночастицы, такой эффект вносил дополнительное упорядочивание и приводил к увеличению сродства к субстрату тестостерону по сравнению с наночастицами, модифицированными -ОН группами, значение кажущейся константы Михаэлиса  $K_M^{app}$  составляло 244,82 мкМ и 611,07 мкМ, для модификации -NH<sub>2</sub> и -ОН группами, соответственно [130].

Для исследования кинетических параметров СУР3А4 была разработана система нанореактора на основе сложного композита из сфер оксида кремния, нанопористых графеновых пен и полидофамина [132]. Авторы показали, что кинетические параметры реакций СУР3А4-зависимого метаболизма стероидных гормонов зависят от размеров пор наноструктур. При меньшем размере пор наблюдались наиболее благоприятные параметры реакции. Для пор размером 65 нм, 120 нм и 260 нм, были получены следующие значения кажущейся константы Михаэлиса  $K_M^{app}$  для реакции СУР3А4-зависимого гидроксирования тестостерона:  $110 \pm 18$  мкМ,  $276 \pm 28$  мкМ,  $333 \pm 25$  мкМ, соответственно, в сравнении с композитом без пор ( $430 \pm 30$  мкМ). Изменение данного параметра свидетельствует об увеличении сродства фермента к субстрату и повышении

эффективности каталитического процесса почти в 4 раза для наименьшего диаметра пор (65 нм).

### **1.6.3.1. Иммобилизация микросом на электродах**

В качестве источников цитохромов P450, для исследований *in vitro* могут быть использованы микросомы, получаемые при гомогенизации тканей из компонентов эндоплазматического ретикулума [70]. Особый интерес вызывают микросомы печени, содержащие изоформы цитохрома P450, а также белки редокс-партнеры CPR, цитохром *b<sub>5</sub>*. При этом компоненты микросом окружены мембраной, что способствует сохранению структуры фермента и каталитической активности. Среди публикаций, посвященных созданию электрохимических биосенсоров на основе микросом, можно обозначить два основных направления: создание биосенсоров для анализа лекарственных веществ и разработка биореакторов для получения функционально значимых метаболитов.

В ряде работ микросомы печени крыс [135] и человека [136-140] применялись для создания электрохимических систем. Микросомы печени крысы, содержащие CYP3A, 2C, 2E1, 1A и 4A, послойно иммобилизовали методом капельного нанесения на электроде из пиролитического графита, модифицированном поли(диаллилдиметиламмоний хлоридом) [135]. Авторы наблюдали обратимую пару пиков окисления и восстановления, со средним потенциалом -0,48 В (относительно каломельного электрода) при pH 7, и отнесли данные пики к превращению редуктазы на электроде.

Описаны методы иммобилизации микросом непосредственно на электроде, без использования модификаторов или медиаторов электронного транспорта. В таких системах роль модификатора, защищающего фермент от денатурации на поверхности электрода, выполняют фосфолипиды оболочки микросом. Впервые такой подход был реализован в работе [136], авторы использовали электроды, изготовленные из различных материалов: пиролитического графита, стеклоуглерода или графита высокой степени очистки, при этом обладающие различной неоднородностью поверхности. Авторы установили, что различная неоднородность поверхности электродов влияет на электрохимические параметры, при этом гетерогенная константа скорости переноса электронов выше для электродов из более однородных (гладких) материалов, таких как стеклоуглеродный электрод. Однако, количество электроактивного белка, по расчетам авторов, было больше для электродов с неоднородной поверхностью, что можно объяснить более развитой поверхностью для включения белка. В работе [137] авторы исследовали влияние неоднородности поверхности электрода на электрохимические характеристики микросом с использованием дискового электрода. Целью работы было создание биосенсора с прямой иммобилизацией микросом

на поверхности электрода, без дополнительных медиаторов электронного транспорта. Дисковые электроды из высокочистого графита легко возобновляемы путем полировки. Авторы выяснили что оптимальным для иммобилизации микросом является поверхность электрода с неоднородностью ~8 мкм, более гладкая поверхность хоть и способствует увеличению скоростей переноса электронов, однако снижает ток в присутствии кислорода, негативно сказываясь на эффективности метаболизма субстрата.

Для исследования свойств микросом печени человека для каталитического превращения стероидных гормонов в электрохимических системах применялись многостенные углеродные нанотрубки [138], а также многокомпонентные системы, состоящие из покрытых полидофамином наночастиц золота на подложке из графена [139]. В работе [138] отмечали снижение кажущейся константы Михаэлиса микросом по отношению к тестостерону, при переходе от прямой иммобилизации микросом на электроде  $K_M^{app} = 480 \pm 51$  мкМ, к иммобилизации на электроде, модифицированном многостенными углеродными нанотрубками  $K_M^{app} = 290 \pm 33$  мкМ. В работе [139] был предложен метод иммобилизации, основанный на электростатическом взаимодействии отрицательно заряженных фосфолипидных оболочек микросом с модифицированными аминогруппами магнитными наночастицами, адсорбированных на электродах из пиролитического графита. Данный подход позволили увеличить чувствительность биосенсора к субстратам цитохромов P450, за счет увеличения площади поверхности, доступной для иммобилизации микросомальных частиц.

С развитием молекулярной и клеточной биологии появились методики коэкспрессии одновременно цитохрома P450, редуктазы и цитохрома b<sub>5</sub> в бактериальных культурах клеток, инфицированных рекомбинантными бакуловирусами. Получаемые данным методом биологические материалы коммерчески доступны и реализуются под различными наименованиями: бакулосомы (Baculosomes™ компания ThermoFisher), бактосомы (Bactosomes™ компания Сурех), суперсомы (Supersomes™ разработанные компанией Gen Test), [141, 142].

Микросомы клеток насекомых, содержащие CYP1A2 и 3A4, произведенные компанией Gen Test, были послойно совместно с полиэтиленгликолем иммобилизованы на электроде из пиролитического графита [143]. Авторы оценивали электрохимические параметры полученных систем, в обеих системах наблюдался полупотенциал пиков -0,49 В (относительно каломельного электрода, при 0,1 В/с). Оценку каталитической активности CYP1A2 и 3A4 проводили по образованию оксида стирола.

Применение бактосом для создания биокатализаторов было продемонстрировано в работе [144]. В качестве рабочего электрода авторы использовали покрытые золотом

кристаллы кварца, модифицированные самоорганизующимися слоями цистеамина, с адсорбированными пленками бактосом. В исследовании использовались бактосомы, содержащие следующие комбинации белков CYP2C9, CPR, CYP2C9 + CPR, CYP3A4 + CPR. В качестве субстрата был выбран диклофенак, подвергающийся гидроксированию под действием CYP2C9 и CYP3A4. Авторы оценили эффективность электрокатализа различных систем, и продемонстрировали значимость CPR в бактосомальных пленках для эффективности катализа, а также благотворное влияние каталазы на скорость реакции.

### **1.7. Выводы**

Развитие современной медицины и фармакологии, требует помимо клинических испытаний эффективности препаратов в системах *in vivo*, проведение исследований возможных межлекарственных взаимодействий, вызванных этими препаратами в системах *in vitro*. Перечисленные выше методы *in vitro* помогают не только выявлять межлекарственные взаимодействия, но и предсказывать возникновение межлекарственных взаимодействий, анализируя кинетические параметры модельных ферментных систем. Поскольку цитохромы P450 являются важнейшими ферментами, имеющими практическую значимость, необходимо создание более эффективных электрохимических систем, позволяющих анализировать каталитическую активность цитохрома P450 и предсказывать межлекарственные взаимодействия, а также повышать эффективность электрокатализа для получения биологически активных соединений в системах цитохромов P450 как биокатализаторов.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1. Реактивы

Следующие реактивы, использованные в работе, были получены от ООО “Спектр-Хим” (Россия): аммоний уксуснокислый, чистота > 98 %, ацетат аммония, чистота > 98 %, гидроксид калия, чистота > 99 %, калий фосфорнокислый двузамещенный, чистота > 98 %, лимонная кислота, чистота > 98 %, натрий фосфорнокислый однозамещенный, чистота > 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). Водная дисперсия 0,2 % одностенных углеродных нанотрубок (диаметр  $1,6 \pm 0,4$  нм, длина  $\geq 5$  мкм, площадь поверхности 1000 м<sup>2</sup>/г) стабилизированных карбоксиметилцеллюлозой TUBALL™ BATT H<sub>2</sub>O получена от “OCSIAL” (Россия). Омепразол, чистота  $\geq 99\%$  получен от “AstraZeneca” (Великобритания).

#### 2.1.2. Препараты ферментов и белков

Стрептолизин О из *Streptococcus pyogenes* (экспрессированный в *Escherichia coli* ~ 1 000000 Ед/мг) и пероксидаза хрена (активность ~ 150 МЕ/мг) получены от Sigma-Aldrich.

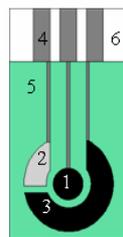
Препарат рекомбинантного СУР3А4 концентрацией 142 мкМ и рекомбинантного СУР2С9 концентрацией 210 мкМ в 550 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,2, содержащем 0,2% CHAPS, 1 мМ дитиотреитол и 20% глицерин получены в институте биоорганической химии НАН Беларуси как описано ранее [145-147]. Рекомбинантные изоформы цитохрома Р450 были модифицированы на N-конце. Чистота и концентрация фермента были установлены по характеристической полосе поглощения при длине волны 450 -490 нм  $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ .

#### 2.1.3. Бактосомы

СУР3А4 и цитохром Р450-зависимая редуктаза человека были коэкспрессированы из *Escherichia coli* и дополнены очищенным цитохромом *b*<sub>5</sub> в трис-ацетатном буфере (рН 7,6), содержащим 250 мМ сахарозы, 0,025 ЭДТА, были закуплены Cytex Ltd. (Dundee, Scotland, UK), конечная концентрация СУР3А4 составляла 4 мМ.

## 2.2. Оборудование

Электрохимические измерения проводили с использованием потенциостата Autolab PGSTAT 302N (“Metrohm Autolab”, Нидерланды). Программное обеспечение NOVA 2.0. В работе использовали печатный графитовый электрод (ПГЭ), полученный методом трафаретной печати (ООО «КолорЭлектроникс», Москва, <http://www.colorel.ru/>); рабочий электрод – графитовый, вспомогательный электрод – графитовый, электрод сравнения – хлоридсеребряный (рис. 5). Диаметр рабочего электрода 0,2 см (площадь 0,0314 см<sup>2</sup>).



**Рисунок 5.** Печатный графитовый электрод (ПГЭ): 1 – рабочий графитовый электрод; 2 – хлоридсеребряный электрод сравнения; 3 – вспомогательный электрод; 4 – серебряные контакты; 5 – изолирующий слой на основе ПВХ; 6 – слой ПВХ).

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре CARY 100 Scan UV-Vis (Agilent, Нидерланды) с программным обеспечением Cary Win UV.

Масс-спектрометрические исследования проводились научным сотрудником лаборатории системной биологии 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).

Микрофотографии поверхностей были сделаны ведущим инженером лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ Канащенко С.Л. с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S 5500 (Hitachi, Япония).

Изображения топологии поверхности были сделаны научным сотрудником Научного центра мирового уровня «Цифровой дизайн и персонализированное здравоохранение» ИБМХ Краевским С.В. с использованием оборудования центра коллективного пользования «Протеом человека» ИБМХ с помощью атомно-силового микроскопа Dimension FastScan (Bruker, США) снабженного коммерческими Fastscan-A (Bruker, США) кантилеверами.

Анодоскопы были нарезаны на круги с помощью волоконного лазера «МиниМаркер 2» (Минимаркер, Россия) ведущим научным сотрудником кафедры неорганической химии МГУ им. М.В. Ломоносова Напольским К.С.

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).

Встряхивание растворов проводилось на Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc., США).

Построение и анализ экспериментальных кривых выполнено с помощью программы Origin Pro 8.0.

## **2.3. Приготовление ферментных электродов**

### **2.3.1. Приготовление ферментного электрода на основе цитохрома P450 3A4, 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 СYP3A4. Для иммобилизации фермента в составе ДДАБ на поверхности рабочего графитового электрода, электроды оставляли при температуре +4°C на 12 часов во влажной камере.

### **2.3.2. Приготовление электродов на основе цитохрома P450 3A4 и 2C9, модифицированных комплексами фермента с рибофлавином, флавинмононуклеотидом (ФМН), флавинадениндинуклеотидом (ФАД)**

Для иммобилизации СYP3A4 или СYP2C9 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 или 210 мкМ) смешивали с 1 мкл 142 мкМ СYP3A4 или 1 мкл 210 мкМ СYP2C9, и тщательно перемешивали, проводили инкубацию в течение 5 мин и затем наносили на поверхность ПГЭ/ДДАБ. Для контрольных экспериментов 1 мкл 142 мкМ СYP3A4 или 1 мкл 210 мкМ СYP2C9 разбавляли 1 мкл буфера. Электроды выдерживали при температуре +4°C 12 ч во влажной камере.

### **2.3.3. Приготовление ферментных электродов, модифицированных нанопористым оксидом алюминия (Anodisc)**

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  $\mu\text{m}$ , cat No.6809-7013) и 0,2 мкм (Anodisc 13, Whatman 0,2  $\mu\text{m}$ , cat No.6809-7023).

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 СУР3А4. Электроды выдерживали при температуре +4°C 12 ч во влажной камере.

#### **2.3.4. Приготовление ферментных электродов, модифицированных стрептолизином О**

Для модификации электрода стрептолизином 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 СУР3А4 или 2 мкл бактосом, содержащих цитохром Р450 3А4 (СУР3А4ВR). Электроды выдерживали при температуре +4°C 12 ч во влажной камере.

#### **2.3.5. Иммуобилизация бактосом на электроде**

Иммуобилизацию бактосом СУР3А4ВR проводили на ПГЭ модифицированные ДДАБ, по методике, описанной выше. Для этого после высыхания ДДАБ на электрод наносили 2 мкл бактосом. Затем электроды помещали во влажную камеру при температуре +4°C на 12 часов.

### **2.4. Электрохимические измерения**

Перед началом всех электрохимических измерений электроды инкубировали в электролитном буфере (0,1 М калий-фосфатный буфер, рН 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, рН 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.

#### **2.4.1. Электрохимические измерения в анаэробных условиях**

Измерения проводили в герметично закрытой плексигласовой ячейке с помещенным в нее ферментным электродом. Ячейку заполняли 1 мл электролитного буфера, герметично

закрывали, в течение 30 минут пропускали аргон. Параметры регистрации циклических вольтамперограмм: диапазон потенциалов от +0,1 до -0,7 В, скорости сканирования 0,01 до 0,1 Вс<sup>-1</sup>.

#### **2.4.2. Электрохимические измерения в аэробных условиях**

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<sup>-1</sup>.

#### **2.5. Определение продуктов цитохром Р450-зависимых реакций**

##### **2.5.1. Определение N-деметилазной активности цитохрома Р450 3А4 по отношению к эритромицину**

N-деметилазную активность СYP3A4 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) [149], коэффициент молярного поглощения образующегося соединения  $\epsilon_{412} = 4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Ферментный электрод помещали в электрохимическую ячейку с 1 мл электролитного буфера, содержащего 100 мкМ эритромицин, или содержащего 100 мкМ эритромицина и 100 мкМ омепразола. Цитохром Р450-зависимый электролиз проводился в течение 20 минут при контролируемом потенциале рабочего электрода -0,5 В. 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.

##### **2.5.2. Исследование гидроксилазной активности цитохрома Р450 3А4, по отношению к диклофенаку**

Для исследования каталитической активности СYP3A4 по отношению к диклофенаку использовали методику регистрации тока электроокисления диклофенака на немодифицированном печатном графитовом электроде, измеренном до электролиза и после электролиза [150]. 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. Ферментный электрод помещали в электрохимическую ячейку с 1 мл электролитного буфера, содержащего 100 мкМ диклофенака.

### **2.5.3. 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 к 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  $\geq 5$  мкм, площадь поверхности 1000 м<sup>2</sup>/г) стабилизированных карбоксиметилцеллюлозой TUBALL™ ВАТТ Н<sub>2</sub>О десятикратно разбавленной дистиллированной водой [151]. С этой целью модифицированный печатный графитовый электрод, предварительно обработанный путем сканирования методом квадратно-волновой вольтамперометрии (КВВА) в диапазоне потенциалов 0–1,2 В, частоте 25 Гц, амплитуде 0,04 В, четыре скана, наносили 60 мкл раствора, отобранного из электрохимической ячейки после электролиза.

### **2.5.4. Спектрофотометрическое определение пероксида водорода, образующегося в ходе электрокаталитической реакции**

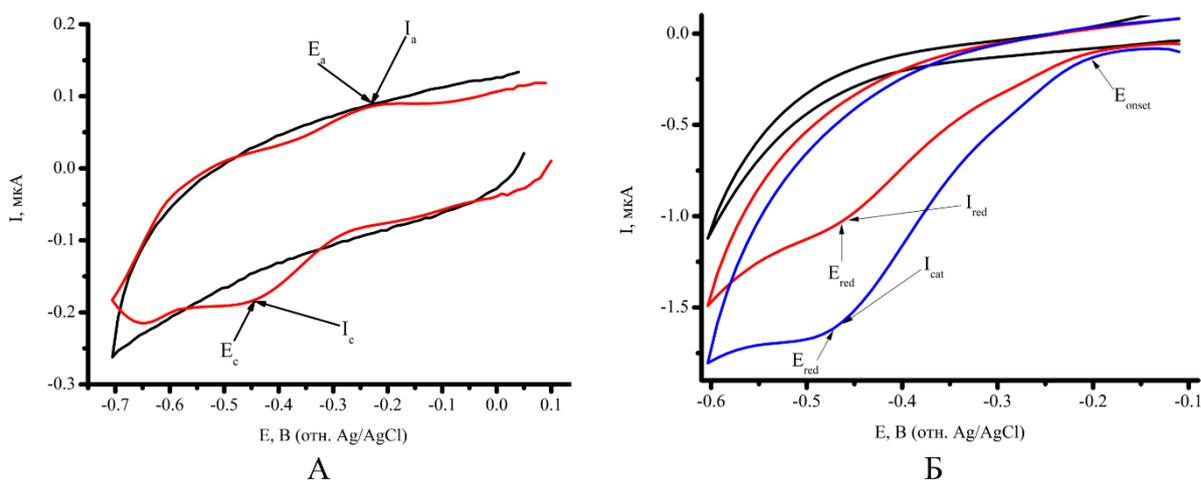
Пероксид водорода определялся по реакции с пероксидазой хрена и ее субстратом 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота) (АБТС). Для приготовления раствора АБТС концентрацией 0,4 мМ, навеску АБТС массой 0,001 г растворяли в 5 мл цитратного буфера, содержащего 51 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 24 мМ лимонной кислоты. Препарат пероксидазы хрена массой 0,004 г растворяли в 1 мл 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 20% глицерина (по объему). Для оценки количества образовавшегося пероксида водорода в результате электрокаталитической реакции к раствору, отобранному из электрохимической ячейки после электролиза объемом 38 мкл добавляли 10 мкл раствора АБТС и 2 мкл раствора пероксидазы хрена. После тщательного перемешивания измеряли оптическую плотность при длине волны 405 нм,  $\epsilon_{405}=36 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ .

## Глава 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. Электрохимические системы на основе цитохрома P450 для моделирования межлекарственных взаимодействий

#### 3.1.1. 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 (Рисунок 6 А, Б). 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  $-0,3 \div -0,5$  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 гемопротеина на электроде  $\Gamma_0$ , ( $\Gamma_0 = \frac{Q}{zAF}$ , 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. Параметр  $E_{onset}$  - значение потенциала в точке перегиба, определяемое из циклической вольтамперограммы в аэробных условиях при добавлении субстрата цитохрома P450.



**Рисунок 6.** (А) Циклические вольтамперограммы в анаэробных условиях ПГЭ/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 (красная линия). (Б) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 (красная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4+100мкМ эритромицин (синяя линия). Скорость сканирования 0,1 Вс<sup>-1</sup>.

**Таблица 1.** Электроаналитические параметры СУР3А4, иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ в анаэробных условиях.

Электрод	$E_c$ , В	$E_a$ , В	$E^0$ , В	$\Delta E$ , В	$k_s$ , с <sup>-1</sup>	$\Gamma_0$ , моль/см <sup>2</sup>
ПГЭ/ДДАБ/ СУР3А4	-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 <sup>-11</sup>

Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трех независимых экспериментов. Данные получены в лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ и опубликованы в [152].

Проанализированы электрохимические параметры СУР3А4-сенсора (ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4) при взаимодействии с субстратами СУР3А4: омепразол, тестостерон, диклофенак, эритромицин и кортизол (Таблица 2).

**Таблица 2.** Электрохимические параметры циклических вольтамперограмм ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 в присутствии 100 мкМ субстратов, скорость сканирования 0,1 В/с.

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

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

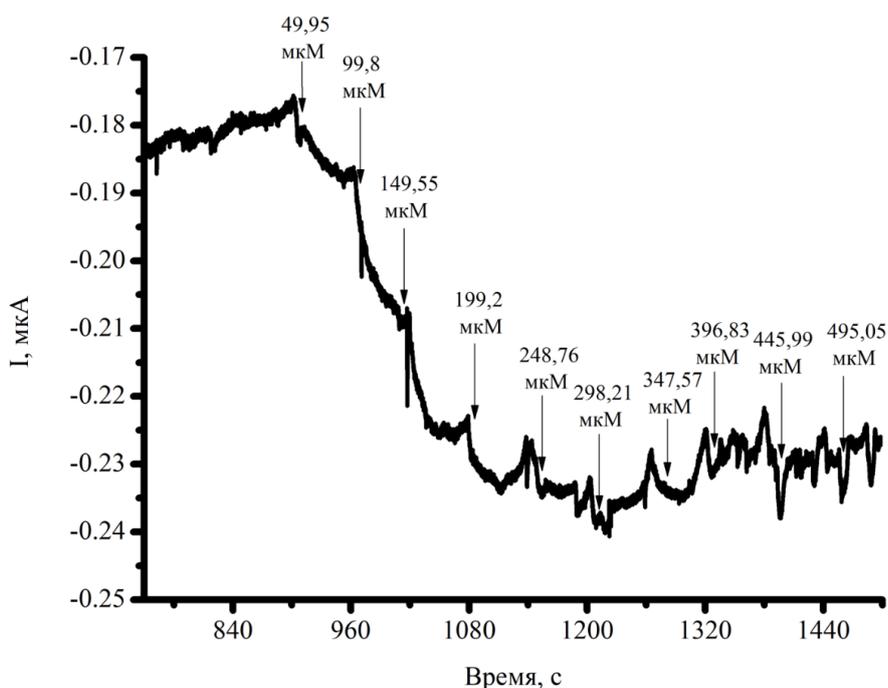
Значение потенциала начала катализа,  $E_{onset}$ , можно использовать в качестве прогностического при анализе возможного межлекарственного взаимодействия. На основе полученных значений  $E_{onset}$  и анализа метаболитов СУР3А4-зависимых каталитических реакций был сделан вывод, что в первую очередь метаболизируется субстрат, имеющий более положительный потенциал начала катализа  $E_{onset}$  [153].

### **3.1.2. Анализ каталитической активности рекомбинантного цитохрома Р450 3А4 для исследования межлекарственных взаимодействий препаратов, применяемых в комплексной терапии при лечении заболеваний ЖКТ, связанных с инфицированием *Helicobacter pylori***

Разработана система на основе ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 для исследования межлекарственного взаимодействия препаратов применяемых при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта, вызванных инфицированием *Helicobacter pylori*. Для эрадикации бактерии *Helicobacter pylori* используют комбинацию лекарственных препаратов, таких как ингибиторы протонного насоса, снижающие кислотность среды желудка и переводя бактерии в состояние восприимчивое к антибиотикам – омепразол, пантопразол, и макролидные антибиотики, обладающие широким бактериостатическим действием – кларитромицин, амоксицилин, метронидазол, тинидазол. Кларитромицин является синтетическим аналогом эритромицина, который является субстратом СУР3А4, и

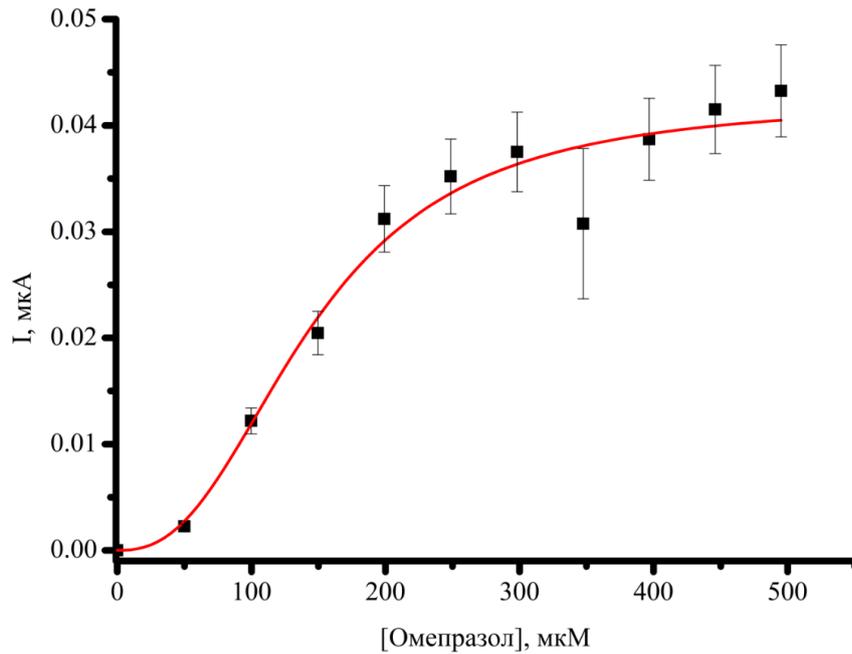
подвергается N-деметилованию, в результате которого образуется формальдегид, образующий окрашенный продукт с реактивом Нэша, что позволяет оценить каталитическую активность СУР3А4 по отношению к эритромицину.

На рис. 7 представлена кривая титрования ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4-сенсора субстратом – омепразолом в координатах ток - время.



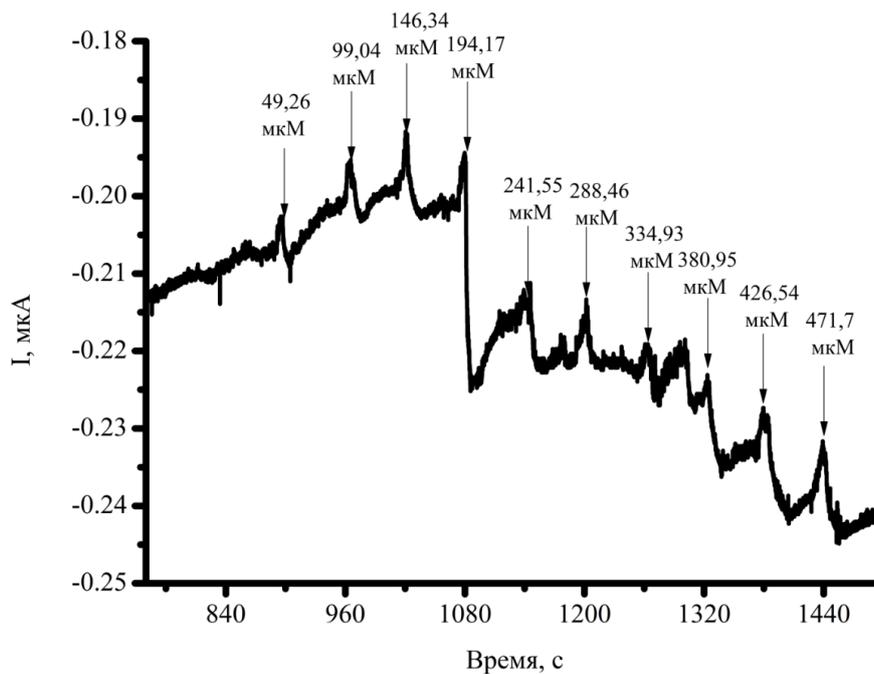
**Рисунок 7.** Хроноамперометрическое титрование ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 омепразолом. Титрование проводили при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,5 В в аэробных условиях, 50 мМ раствором омепразола в этаноле, концентрация этанола в ячейке не превышала 1% по объему.

Электрокаталитическую активность СУР3А4 по отношению к омепразолу определяли методом амперометрии. На рис. 8 представлена зависимость каталитического тока восстановления фермента от концентрации субстрата – омепразола.



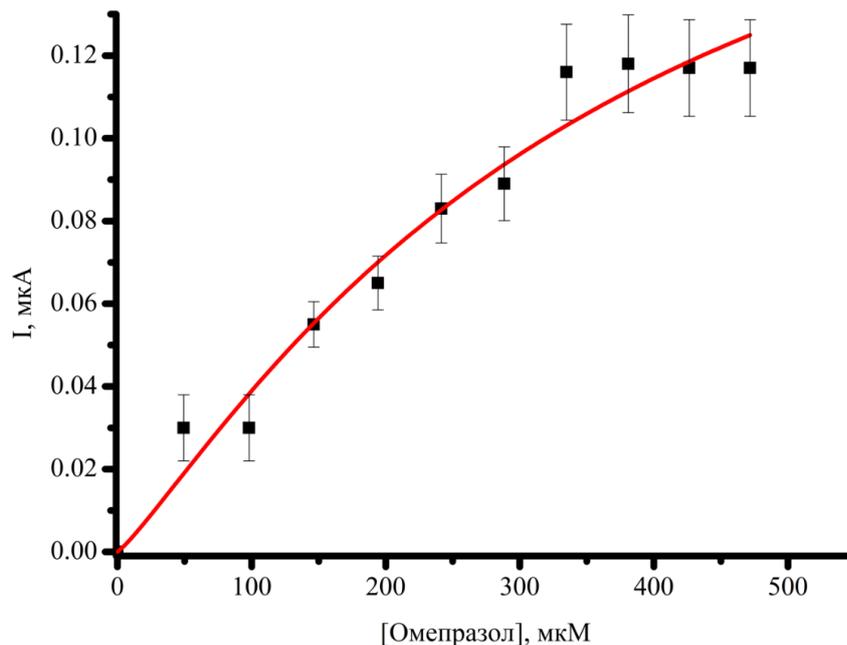
**Рисунок 8.** Зависимость каталитического тока ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4, от концентрации омепразола, регистрируемая амперометрическим методом при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,5 В.

Для исследования совместного влияния омепразола и эритромицина на электрокаталитическую активность СУР3А4, регистрировали зависимость изменения каталитического тока СУР3А4 от концентрации омепразола для эксперимента, в котором к ферментному электроду сначала был добавлен эритромицин, а затем проводили титрование омепразолом. На рис. 9 представлена кривая титрования ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4-сенсора омепразолом в присутствии 100  $\mu\text{M}$  эритромицина.



**Рисунок 9.** Хроноамперометрическое титрование ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 омепразолом, в присутствии 100 мкМ эритромицина. Титрование проводили при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,5 В в аэробных условиях, 50 мМ раствором омепразола в этаноле, концентрация этанола в ячейке не превышала 1% по объему.

Электрокаталитическая активность СУР3А4 по отношению к омепразолу определялась методом амперометрии. На рис. 10 представлена зависимость каталитического тока восстановления фермента от концентрации субстрата – омепразола, в присутствии эритромицина.



**Рисунок 10.** Зависимость каталитического тока ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4, от концентрации омепразола, в присутствии эритромицина регистрируемая амперометрическим методом при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,5 В.

Регистрируемая амперометрическим методом зависимость каталитического тока СУР3А4 от концентрации омепразола, представленная на рис. 8 и рис. 10, имеет сигмоидный характер, указывающий на возможность одновременного связывания нескольких молекул омепразола в активном центре фермента. Данная зависимость была проанализирована с помощью модели Хилла для взаимодействия более чем одной молекулы субстрата с ферментом [154]:

$$I_{cat} = \frac{I_{catmax}[R]^n}{K_{0.5}^n + [R]^n}$$

где:  $I_{cat}$  – каталитический ток (А),  $I_{catmax}$  – максимальный каталитический ток при насыщающей концентрации субстрата (А),  $[R]$  – концентрация субстрата (М),  $K_{0.5}$  – концентрация субстрата, при которой значение каталитического тока равно  $1/2I_{catmax}$  (М),  $n$  – коэффициент Хилла.

Полученные в ходе хроноамперометрического титрования данные обобщены в таблице 3.

**Таблица 3.** Электрохимические параметры СУР3А4, иммобилизованного на ПГЭ модифицированном ДДАБ.

Электрохимическая система	$I_{catmax}$ , мкА	$K_{0,5}$ , мкМ	$n$
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 + омепразол	$0,043 \pm 0,002$	$148 \pm 7$	$2,6 \pm 0,3$
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 +100 мкМ эритромицина + омепразол	$0,22 \pm 0,12$	$369 \pm 2$	$1,2 \pm 0,4$

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

Значения  $I_{catmax}$  и  $K_{0,5}$  были рассчитаны как  $0,043 \pm 0,002$  мкА и  $148 \pm 7$  мкМ, соответственно. Коэффициент Хилла  $n$  составил  $2,6 \pm 0,3$ , что свидетельствует о кооперативном эффекте взаимодействия лиганда с СУР3А4 [78, 155-158]. В присутствии 100 мкМ эритромицина зависимость каталитического тока СУР3А4 от концентрации омепразола также сохраняет сигмоидный характер (рис. 12), при этом значения  $I_{catmax}$  и  $K_{0,5}$  были рассчитаны как  $0,22 \pm 0,12$  мкА и  $369 \pm 20$  мкМ, соответственно. Коэффициент Хилла  $n$  был определен как  $1,2 \pm 0,4$ . Увеличение значения  $I_{catmax}$  может быть объяснено одновременным присутствием двух субстратов цитохрома Р450 и синергическим влиянием на каталитический ток. Увеличение значения  $K_{0,5}$  указывает на конкуренцию двух субстратов за взаимодействие с активным центром фермента. Снижение величины коэффициента Хилла свидетельствует об уменьшении кооперативного эффекта взаимодействия омепразола с ферментом в присутствии эритромицина, поскольку связывание последнего может препятствовать связыванию дополнительных молекул омепразола с активным центром СУР3А4.

Для анализа влияния двух лекарственных препаратов с разным терапевтическим действием на метаболизм каждого из них был проведен ряд экспериментов по накоплению продуктов электрокатализа, и последующего анализа этих продуктов.

Анализ продуктов каталитических превращений 100 мкМ омепразола в отсутствие и в присутствии 100 мкМ эритромицина в системе с иммобилизованным на электроде СУР3А4 был проведен с помощью масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье с ионизацией электроспреем. Как в отсутствие, так и в присутствии

эритромицина, масс-спектрометрический анализ выявил наличие пика с величиной  $m/z$  346,4245, соответствующий расчетному значению  $m/z$  для омепразола  $[C_{17}H_{20}N_3O_3S]^+$ , и пик со значением  $m/z$  362,1162, соответствующий расчетному значению  $m/z$  продукта СУР3А4-зависимого окисления омепразола – омепразол сульфона  $[C_{17}H_{20}N_3O_4S]^+$  (Приложение 2). Отношение интенсивности пика с  $m/z$  362,1162 к интенсивности пика с  $m/z$  346,4245 в отсутствии эритромицина составило  $0,062 \pm 0,006$ , при этом данное отношение интенсивностей пиков в присутствии 100 мкМ эритромицина составило  $0,060 \pm 0,005$ . Таким образом, можно заключить, что эритромицин при данных условиях не оказывает статистически значимого влияния на СУР3А4-зависимую биотрансформацию омепразола.

Полученная каталитическая константа реакции N-деметилирования эритромицина составляла  $13,8 \text{ мин}^{-1}$ . При внесении в реакционную смесь 100 мкМ омепразола каталитическая константа снижалась и составляла  $4,7 \text{ мин}^{-1}$ , это свидетельствует о конкуренции двух субстратов СУР3А4 - эритромицина и омепразола, при одновременном связывании в объемном активном центре фермента [78, 156].

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных, можно сделать вывод, что омепразол снижает каталитическую активность СУР3А4 по отношению к эритромицину, по причине кооперативного связывания омепразола в активном центре СУР3А4 и возможного стерического затруднения при взаимодействии эритромицина с активным центром СУР3А4, что возможно также объясняет слабое влияние эритромицина на эффективность метаболизма омепразола [159].

Используя подход для оценки МЛВ на основе анализа потенциала начала катализа ( $E_{\text{onset}}$ ), описанный выше (п. 3.1.1), для пары лекарственных препаратов омепразола и эритромицина, метаболизируемых СУР3А4, было предположено действие омепразола как «лидирующего» субстрата ( $E_{\text{onset}} = -0,200 \text{ В}$ ), который метаболизируется в первую очередь, что приводит к снижению скорости метаболизма эритромицина ( $E_{\text{onset}} = -0,215 \text{ В}$ ), что было подтверждено при анализе каталитических параметров электроферментативной реакции, катализируемой СУР3А4.

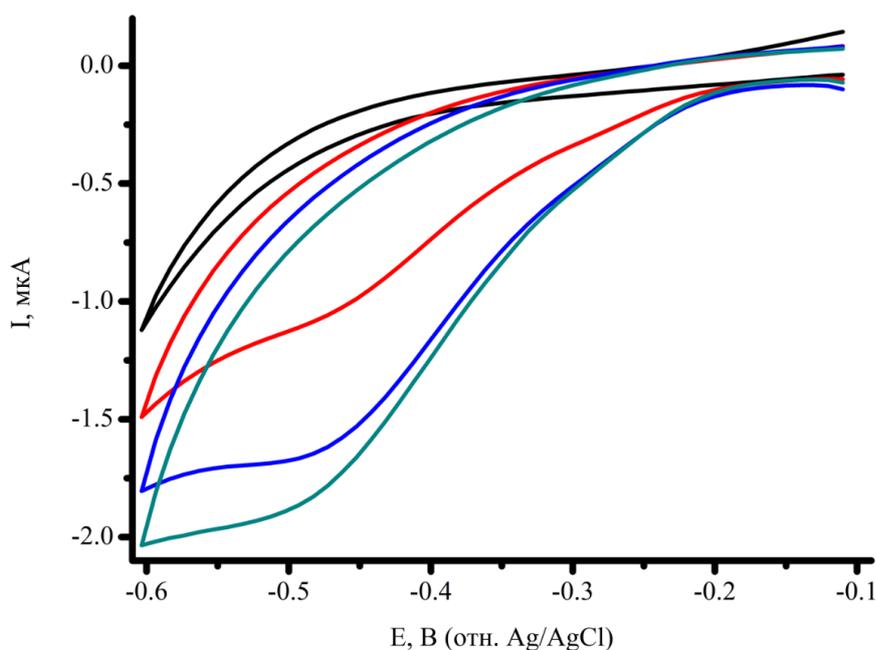
### **3.1. Повышение эффективности электрокатализа электрохимических систем цитохрома Р450**

#### **3.2.1 Каталитический цикл цитохрома Р450 и образование продуктивного фермент-субстратного комплекса как первый шаг к повышению эффективности электрокаталитических процессов**

Особенностью каталитического цикла цитохромов Р450 является многостадийность процесса. Первая стадия в катализе этого класса гемопротеинов – образование комплекса

ферри-формы  $Fe^{3+}$  с субстратом ( $Fe^{3+}$ -RH). Далее происходит перенос первого электрона с образованием комплекса восстановленной ферро-формы  $Fe^{2+}$  с субстратом, а затем и с кислородом в качестве второго субстрата [30, 160-163] (Рис. 3). После этого этапа протекают все последующие стадии каталитического цикла. Для фермента, иммобилизованного (ковалентно или нековалентно) на электроде, или включенного в матрицу модификатора, образование фермент-субстратного комплекса может потребовать большее время за счет диффузии субстрата к активному центру фермента. 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 СУР3А4 в модельной системе по оценки эффективности реакции N-деметилирования эритромицина, и последующим количественным анализом продукта формальдегида, используя реакцию Ханша, с помощью реактива Нэша [152].

На рис. 11 представлены циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4, полученные после добавления субстрата эритромицина и после инкубации с субстратом в течение 30 мин. Как следует из рис. 11, образование фермент-субстратного комплекса на электроде способствует существенному увеличению каталитического тока как характеристики, отражающей активность фермента (Табл. 4).



**Рисунок 11.** Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 (красная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 после добавления 100 мкМ

эритромицина (синяя линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 после инкубации с 100мкМ эритромицина в течение 30 мин (зеленая линия) при скорости сканирования 0,1 Вс<sup>-1</sup>.

**Таблица 4.** Влияние предварительного образования фермент-субстратного комплекса на электрохимические и электрокаталитические параметры ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4.

Электрод	Е, В	І, мкА	Относительная активность, %	V <sub>max</sub> , М мин <sup>-1</sup>
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 <sup>-11</sup>
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 +Эритромицин (30 мин прединкубации)	-0,472±0,009	-0,397±0,015	146±16	1.40±0.17 ×10 <sup>-10</sup>

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.

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

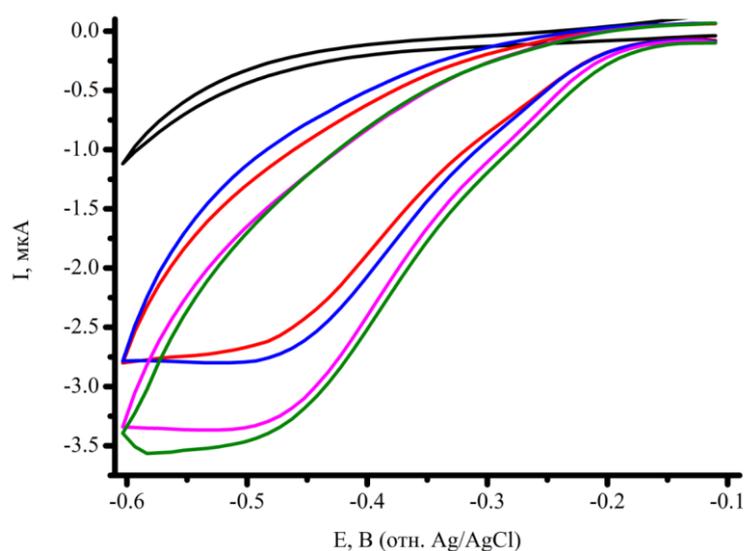
Электрон-транспортная цепь цитохрома Р450 сложна (раздел 1.2, рис. 2), для работы цитохрома Р450 *in vitro* необходимо использование белков редокс партнеров. Ранее в работе [164] проводили ковалентное связывание рибофлавина и СУР2В4 из печени кроликов, с помощью карбонилдиимидазола, исследование проводилось в реконструированной системе, донором протонов выступали НАДФН и НАДН, а транспорт электронов

осуществлялся молекулой рибофлавина. Рибофлавин, ФАД и ФМН были использованы как медиаторы электронного транспорта, замещающие CPR в реконструированных системах на основе бактериальных цитохромов CYP106A2, CYP107DY1, CYP107DY1, HmtS, HmtT, HmtN [105].

Для эффективной работы ПГЭ/ДДАБ/CYP3A4 и ПГЭ/ДДАБ/CYP2C9 предложена электрохимическая система, позволяющая смоделировать электрон транспортную цепь в электрохимической системе. Прототипом НАДФН – зависимой цитохром P450 редуктазы (CPR) выступают молекулы флавинов, которые являются простетическими группами в молекуле CPR. Флавины в такой системе выполняют несколько функций: регуляция скорости потока электронов, увеличения сопряженности реакции гидроксирования субстратов, а также внесение положительных конформационных изменений в структуру белка, что также увеличивает эффективность катализа [160-164].

### 3.2.2.1. Флавины для увеличения эффективности электрокатализа цитохрома P450 3A4

Разработана электрохимическая система, использующая для иммобилизации CYP3A4 в нековалентных комплексах с флавинами: рибофлавином, флавинмононуклеотидом (ФМН) и флавинадениндинуклеотидом (ФАД). Соотношение CYP3A4 и флавинов составляло 1:1. На рисунке 12 представлены циклические вольтамперограммы, характеризующие CYP3A4, и его нековалентные комплексы CYP3A4+рибофлавин, CYP3A4+ФАД, CYP3A4+ФМН.



**Рисунок 12.** Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/CYP3A4 (красная линия), ПГЭ/ДДАБ/CYP3A4+рибофлавин (синяя линия),

ПГЭ/ДДАБ/СУРЗА4+ФАД (розовая линия), ПГЭ/ДДАБ/СУРЗА4+ФМН (зеленая линия).  
Скорость сканирования  $0,1 \text{ Вс}^{-1}$ .

Потенциалы восстановления для всех комплексов были близки и не отличались от значения потенциала  $E_{\text{red}}$  для СУРЗА4 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. Данный пик соответствует восстановлению иона  $\text{Fe}^{3+}$  до  $\text{Fe}^{2+}$  в геме, и не характеризует восстановление изоаллоксазинового цикла флавинов. Согласно литературе, восстановление флавинов происходит при потенциале  $-0,5 \text{ В}$  [164], при использовании ПГЭ/ДДАБ потенциал восстановления флавинов смещается до  $-0,655 \text{ В}$  для концентрации  $10 \text{ нг/мл}$  ФМН на электроде. Однако, для концентрации флавинов, используемой для образования комплекса между флавиновым кофактором и цитохромом P450, пика флавинов на ЦВА не обнаружено (приложение 1). Ток восстановления ( $I_{\text{red}}$ ) и поверхностная концентрация электроактивного гемопротейна ( $\Gamma_0$ ) возрастают в ряду ПГЭ/ДДАБ/СУРЗА4, ПГЭ/ДДАБ/СУРЗА4+рибофлавин, ПГЭ/ДДАБ/СУРЗА4+ФМН, ПГЭ/ДДАБ/СУРЗА4+ФАД, что подтверждает предположение о действии флавинов в качестве медиаторов электронного транспорта. Полученные данные обобщены в таблице 5.

**Таблица 5.** Электрохимические характеристики нековалентных комплексов СУРЗА4 и флавинов

Электрод	Е, В	І, мкА	$\Gamma_0$ , моль/ $\text{см}^2$
ПГЭ/ДДАБ/СУРЗА4	$-0,462 \pm 0,010$	$-0,634 \pm 0,042$	$3,60 \pm 0,25$ $\times 10^{-11}$
ПГЭ/ДДАБ/СУРЗА4+рибофлавин	$-0,452 \pm 0,010$	$-0,818 \pm 0,065$	$4,89 \pm 0,34$ $\times 10^{-11}$
ПГЭ/ДДАБ/СУРЗА4+ФАД	$-0,462 \pm 0,007$	$-0,943 \pm 0,054$	$5,55 \pm 0,46$ $\times 10^{-11}$
ПГЭ/ДДАБ/СУРЗА4+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 СУРЗА4, также был исследован для нековалентных комплексов СУРЗА4

и флавинов, при потенциале  $E = -0,5$  В и времени электролиза 20 мин. Полученные в результате этих экспериментов данные обобщены в таблице 6.

**Таблица 6.** Эффективность электрокатализа N-деметилирования эритромицина в системах ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4+флавин.

Электрод	Относительная активность, рассчитанная из концентрации образовавшегося формальдегида (%)	$V_{\max}, M_{\min}^{-1}$
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.

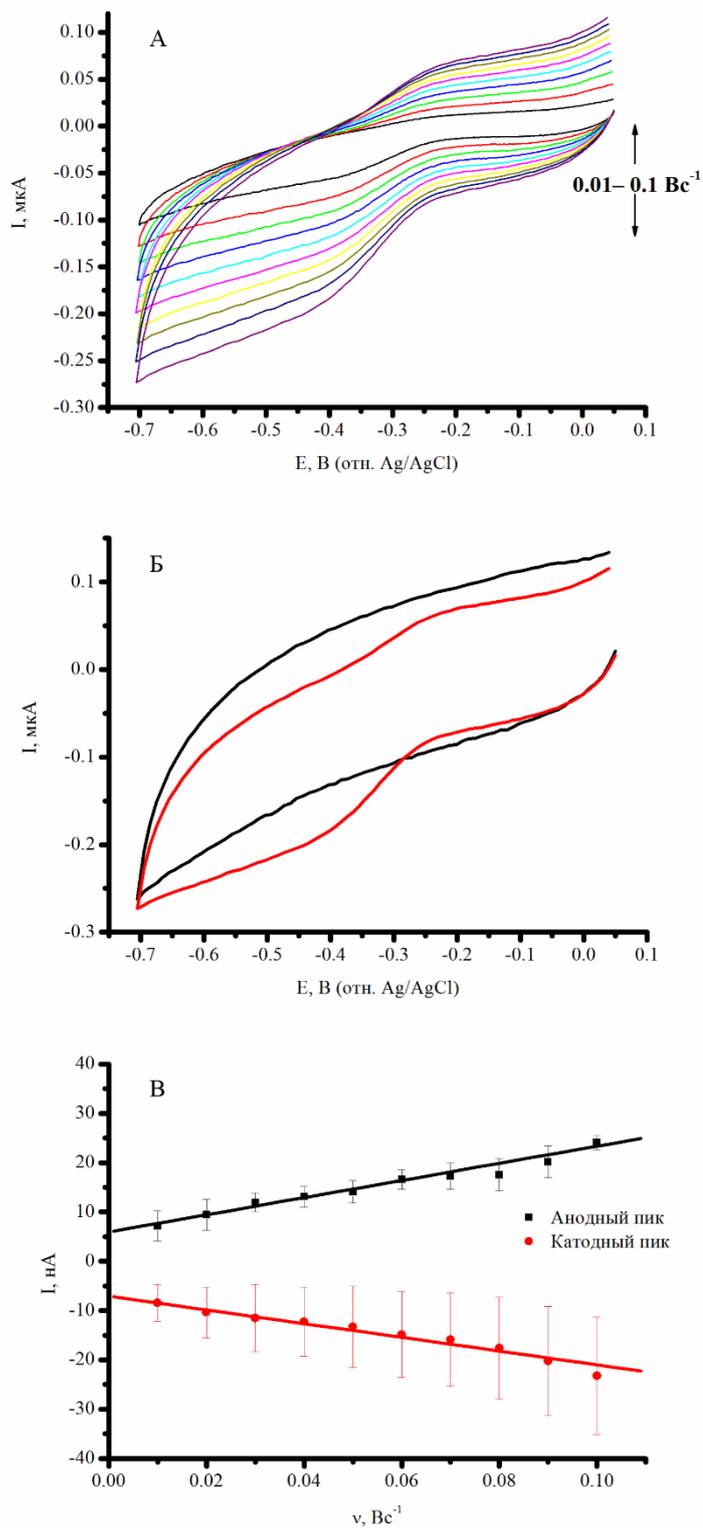
Все предложенные системы увеличивали эффективность электрокатализа СУР3А4, наиболее эффективной является система с ФМН, в таком случае эффективность электрокатализа возрастала в 2 раза [152]. Можно заключить, что отрицательно заряженная фосфатная группа в молекулах ФМН и ФАД может взаимодействовать с мембраноподобным модификатором электрода ДДАБ, заряженным положительно, благодаря атому азота с четырьмя заместителями.

Каталитический цикл цитохромов P450 сопровождается генерацией активных форм кислорода (рис. 3). Была проведен анализ образования пероксида водорода в процессе электрокаталитической реакции, который может образовываться в результате разобщения каталитического цикла цитохрома P450. Концентрацию пероксида водорода оценивали по реакции пероксидазы с АБТС и последующим спектрофотометрическим измерением. Концентрация пероксида водорода в пробах после электролиза составляла  $14,7 \pm 0,6$  мкМ и  $15,2 \pm 1$  мкМ для СУР3А4 и СУР3А4+рибофлавин, соответственно. Это согласуется с литературными данными, так в работе [164] авторы показали, что добавление к реакционной смеси флавоцитохрома СУР2В4 каталазы, существенно не снижает скорость ферментативной реакции N-деметилирования аминопирина и парагидроксилирования

анилина, катализируемых флавоцитохромом CYP2B4. В другой работе, посвященной исследованию влияния рибофлавина на бактериальный цитохром HmtS, не было зарегистрировано образования пероксида водорода в количестве достаточном для его обнаружения [127]. Это подтверждает, что цитохром P450–зависимая реакция не протекает по пероксидазному пути в случае использования комплекса фермента с рибофлавином.

### **3.2.2.2. Флавиновые кофакторы для повышения эффективности электрокатализа цитохрома P450 2C9**

Цитохром P450 2C9 (CYP2C9) один из основных изоферментов цитохрома P450 в организме человека, отвечающий за биотрансформацию лекарственных препаратов с низким терапевтическим окном. К препаратам метаболизируемым CYP2C9 относятся такие значимые лекарственные препараты как диклофенак, S-варфарин, ибупрофен, напроксен, и т.д. [166]. Так как механизм электронного транспорта в цитохром P450-системах является общим [1], было проведено исследование влияния образования комплекса ФАД и CYP2C9, иммобилизованного на ПГЭ, модифицированном ДДАБ (ПГЭ/ДДАБ/CYP2C9+ФАД) на процесс электрохимического восстановления гемопротейна на процесс электрокатализа. ПГЭ/ДДАБ/CYP2C9 и ПГЭ/ДДАБ/CYP2C9+ФАД были охарактеризованы с помощью циклических вольтамперограмм в анаэробных условиях. Циклические вольтамперограммы комплекса CYP2C9 и ФАД в диапазоне потенциалов от 0,1 до -0,7 при скоростях сканирования от 0,01 до 0,1 Вс<sup>-1</sup> демонстрируют пики восстановления и окисления, характерные для процесса CYP-Fe<sup>3+</sup> + e<sup>-</sup> (с электрода) ⇌ CYP-Fe<sup>2+</sup>, протекающем в активном центре фермента (рис. 13А). Линейная зависимость максимальных амплитуд токов от скорости развертки потенциала (рис. 13 В), подтверждает предположение о том, что процесс является адсорбционным, протекает в тонкой пленке белка, и не является диффузионно-контролируемым. Полупотенциал ПГЭ/ДДАБ/CYP2C9+ФАД составлял E<sup>0</sup> = -0,319±0,013 В, что является близким по значению к электроду с иммобилизованным CYP2C9 (ПГЭ/ДДАБ/CYP2C9), E<sup>0</sup> = -0,318±0,010 В. Полученные из циклических вольтамперограмм значения обобщены в таблице 7.



**Рисунок 13.** (А) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9+ФАД в анаэробных условиях при различных скоростях сканирования. (Б) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ/ФАД (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9+ФАД (красная линия) при скорости сканирования 0,1 В/с. (В) Зависимость токов катодного и анодного

пиков ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9+ФАД от скорости сканирования. Перед измерениями через ячейку на протяжении 30 мин пропускали аргон, для достижения анаэробных условий.

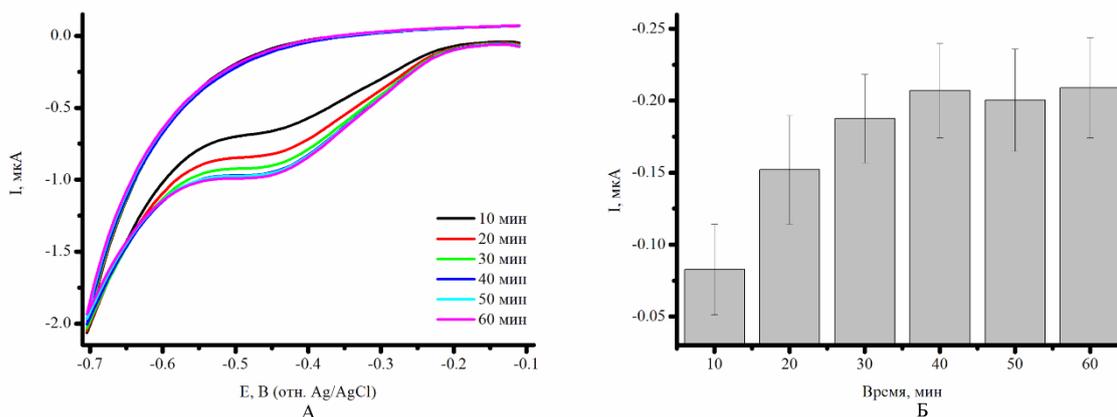
**Таблица 7.** Электроаналитические параметры СУР2С9 и СУР2С9+ФАД иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ.

Электрод	$E_c, В$	$E_a, В$	$E^0, В$	$\Delta E, В$	$k_s, с^{-1}$	$\Gamma_0,$ моль/см <sup>2</sup>
ПГЭ/ДДАБ	-0,383	-0,252	-0,318	0,131	0,54	5,9±1,1
СУР2С9*	±0,006	±0,006	±0,01	±0,01	±0,02	×10 <sup>-12</sup>
ПГЭ/ДДАБ	-0,403	-0,235	-0,319	0,168	0,43	8,2±0,5
СУР2С9+ФАД	±0,011	±0,012	±0,013	±0,006	±0,03	×10 <sup>-12</sup>

Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов. Представленные данные получены ранее в лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ и представлены в статье [166].

В анаэробных условиях наблюдается возрастание количества электроактивного белка на электроде при использовании комплекса СУР2С9 и ФАД, в сравнении с СУР2С9 с 5,9±1,1 ×10<sup>-12</sup> моль/см<sup>2</sup> до 8,2±0,5×10<sup>-12</sup> моль/см<sup>2</sup>.

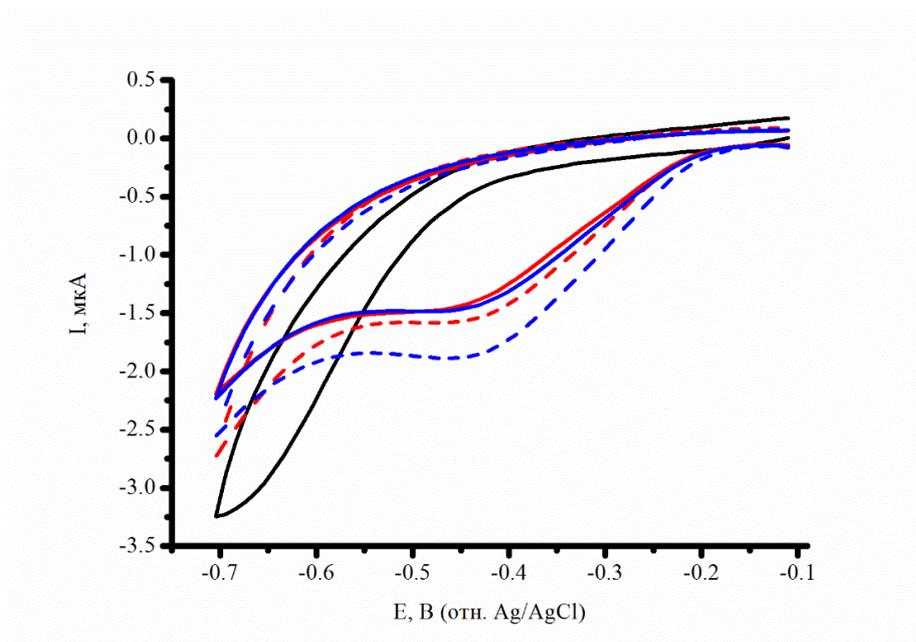
Перед началом исследования каталитической активности комплексов флавинов с СУР2С9 проведен эксперимент для определения оптимальных условий протекания электрохимической реакции. Как было показано в разделе 3.2.1. более длительное время прединкубации увеличивает эффективность протекания электрохимической реакции, а также увеличивает каталитический ток взаимодействия цитохрома Р450 с субстратом. Показана зависимость каталитического тока взаимодействия фермента с субстратом от времени образования фермент-субстратного комплекса на электроде. На рисунке 14 А представлены циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9+ФМН в присутствии 100 мкМ диклофенака после прединкубации. Сравнительная диаграмма величин каталитического тока от времени прединкубации представлена на рисунке 14 Б.



**Рисунок 14.** (А) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9/ФМН в присутствии 100 мкМ диклофенака после преинкубации в течение 10, 20, 30, 40, 50, 60 мин при скорости сканирования 0,1 В/с. (Б) Зависимость величины каталитического тока взаимодействия СУР2С9 с диклофенаком от времени образования фермент-субстратного комплекса.

Показано, что этап предварительного образования фермент-субстратного комплекса, способствует увеличению каталитического тока СУР2С9 в присутствии диклофенака, оптимальным временем преинкубации является 30 мин.

Проведено исследование свойств нековалентных комплексов СУР2С9 и флавинового кофакторы ФАД на ПГЭ/ДДАБ в аэробных условиях с помощью циклической вольтамперометрии, полученные ЦВА представлены на рисунке 15.



**Рисунок 15.** 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  $0,1 \text{ Вс}^{-1}$ .

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. Полученные данные обобщены в таблице 8.

**Таблица 8.** Электроаналитические параметры СУР2С9, СУР2С9+ФАД и СУР2С9+ФМН иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ

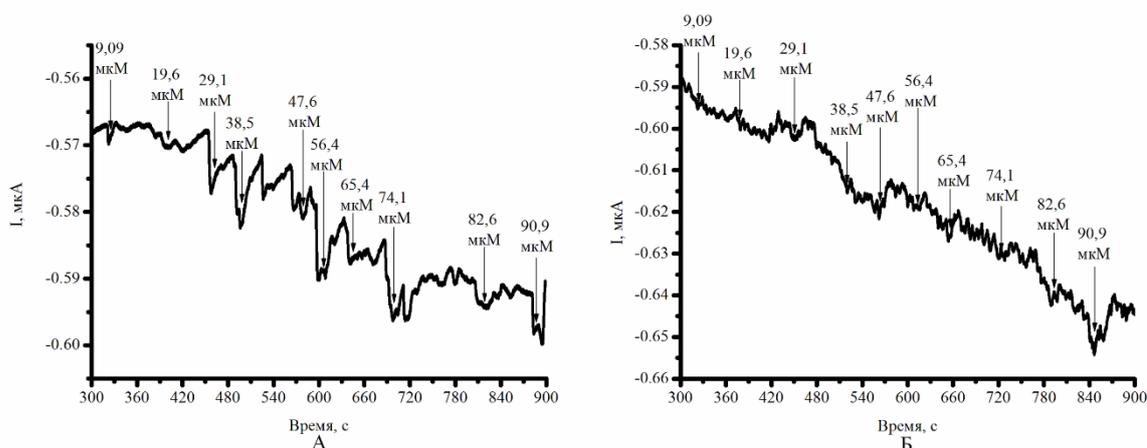
Электрод	$E_{red}, \text{ В}$	$E_{cat}, \text{ В}$	$E_{onset}, \text{ В}$	$I_{O_2}, \text{ А} \times 10^{-7}$	$I_{DF}, \text{ А} \times 10^{-7}$	$I_{DF}/I_{O_2}$
ПГЭ/ДДАБ/ СУР2С9	-0,425 $\pm 0,005$	-0,402 $\pm 0,017$	-0,212 $\pm 0,002$	-4,2 $\pm 0,5 \times 10^{-7}$	-4,8 $\pm 0,4 \times 10^{-7}$	1,14
ПГЭ/ДДАБ/ СУР2С9 +ФАД	-0,420 $\pm 0,008$	-0,407 $\pm 0,007$	-0,211 $\pm 0,001$	-4,8 $\pm 0,7 \times 10^{-7}$	-6,5 $\pm 0,6 \times 10^{-7}$	1,35
ПГЭ/ДДАБ/ СУР2С9 +ФМН	-0,438 $\pm 0,015$	-0,418 $\pm 0,005$	-0,234 $\pm 0,006$	-1,24 $\pm 0,4 \times 10^{-7}$	-1,88 $\pm 0,3 \times 10^{-7}$	1,52

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

При использовании нековалентных комплексов СУР2С9 с флавинами ФАД и ФМН наблюдается увеличение соотношения каталитического тока в присутствии субстрата диклофенака к току восстановления в присутствии кислорода, так соотношение  $I_{DF}/I_{O_2}$  составляло 1,14 для СУР2С9, 1,35 для СУР2С9+ФАД и 1,51 для СУР2С9+ФМН. Для регистрации каталитической эффективности системы использовали хроноамперометрическое титрование субстратом и образование продукта реакции. Титрование ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9+ФАД и ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9+ФМН проводилось 10 мМ раствором диклофенака в метаноле. Концентрация метанола в ячейке не превышала 1% по объему. Измерения проводили в 1 мл калий-фосфатного буфера при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,6 В (отн. Ag/AgCl).

Кинетические параметры комплексов СУР2С9+ФАД и СУР2С9+ФМН иммобилизованных на ПГЭ/ДДАБ, по отношению к диклофенаку определяли методом хроноамперометрии. На рисунках 16 А и 16 Б представлена зависимость каталитического

тока восстановления СУР2С9+ФАД и СУР2С9+ФМН на ПГЭ/ДДАБ при добавлении субстрата диклофенака.

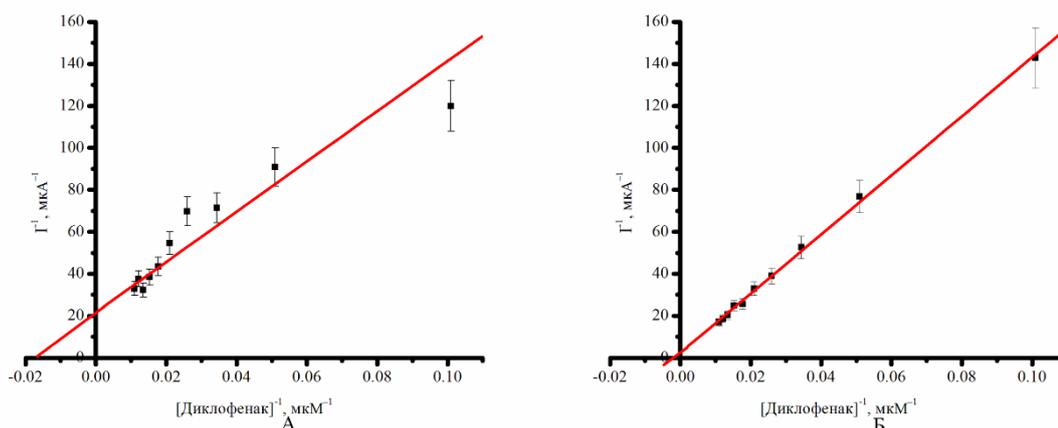


**Рисунок 16.** (А) Хроноамперометрическое титрование ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9+ФМН эритромицином. (Б) Хроноамперометрическое титрование ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9+ФАД эритромицином. Титрование проводили при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,6 В в аэробных условиях, 100 мМ раствором диклофенака в метаноле, концентрация метаноле в ячейке не превышала 1% по объему.

Для определения кинетических параметров взаимодействия иммобилизованного фермента и субстрата, были построены зависимости в двойных обратных координатах ток - концентрация субстрата (рис. 17 А, Б). Для обработки результатов была использована линеаризация уравнения Михаэлиса-Ментен методом Лайнуивера-Берка. Для электрохимической системы уравнение имеет следующий вид:

$$\frac{1}{I_{cat}} = \frac{K_M^{app}}{I_{catmax}[R]} + \frac{1}{I_{catmax}}$$

где:  $I_{cat}$  – каталитический ток (А),  $I_{catmax}$  – максимальный каталитический ток при насыщающей концентрации субстрата (А),  $[R]$  – концентрация субстрата (М),  $K_M^{app}$  – кажущаяся константа Михаэлиса, численно равная концентрации субстрата, при которой значение каталитического тока равно  $1/2I_{catmax}$  (М).



**Рисунок 17.** (А) График Лайнуивера-Берка для хроноамперометрического титрования ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9+ФМН диклофенаком. (Б) График Лайнуивера-Берка для хроноамперометрического титрования ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9+ФАД диклофенаком.

Для определения эффективности конверсии субстрата диклофенака, был проведен электролиз при потенциале  $-0,6$  В в течение 90 мин. Определение концентрации продукта осуществлялось по электроокислению продукта реакции 4'-гидроксидиклофенака. Кинетические параметры и эффективность каталитического процесса обобщены в таблице 9.

**Таблица 9.** Эффективность реакции СУР2С9-зависимого гидроксирования диклофенака.

Электрод	$I_{cat\ max}, A$	$K_M^{app}, M$	$V_{max}, Mмин^{-1}$
СУР2С9	-	$1,17 \pm 0,09$ $\times 10^{-5} *$	$1,89 \pm 0,21$ $\times 10^{-9}$
СУР2С9+FMN	$4,6 \pm 0,5$ $\times 10^{-8}$	$5,49 \pm 0,52$ $\times 10^{-5}$	$2,14 \pm 0,16$ $\times 10^{-9}$
СУР2С9+FAD	$4,1 \pm 0,8$ $\times 10^{-7}$	$5,71 \pm 0,07$ $\times 10^{-4}$	$2,8 \pm 0,29$ $\times 10^{-9}$

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

\*данные приведены из источника [151] и представлены для сравнения.

Кажущаяся константа Михаэлиса диклофенака для комплекса СУР2С9+ФМН  $K_M^{app} = 5,49 \pm 0,52 \times 10^{-5}$  М и имеет значение, близкое к константе Михаэлиса для СУР2С9,  $K_M^{app} = 1,17 \pm 0,09 \times 10^{-5}$  М, согласно работе [151]. Значения для комплекса СУР2С9+ФАД возрастает

и составляет  $K_M^{app} = 5,71 \pm 0,07 \times 10^{-4}$  М. Пространственные структуры комплексов с флавинами были получены ранее [152]. Анализ полученных структур позволил выделить особенности расположения флавинов в проксимальной части белка, известной по связыванию других редокс-партнеров цитохрома P450, при этом не перекрывая участок для связывания субстрата в активном центре фермента.

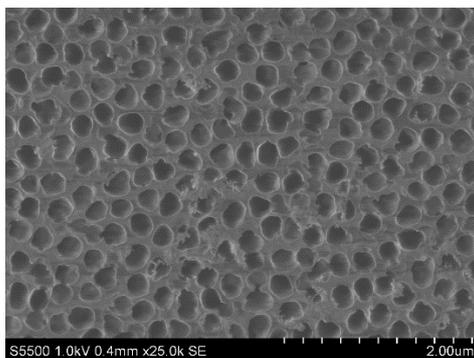
Возрастание значений констант Михаэлиса диклофенака для комплексов CYP2C9+ФМН и CYP2C9+ФАД можно объяснить некоторыми стерическими затруднениями, возникающими при формировании комплексов. Однако, каталитическая активность комплексов по отношению к диклофенаку возрастает. Максимальная скорость реакции CYP2C9  $V_{max} = 1,89 \pm 0,21 \times 10^{-9}$  М·мин<sup>-1</sup>, для комплексов CYP2C9+ФМН и CYP2C9+ФАД  $V_{max}$  увеличивается и составляет  $2,14 \pm 0,16 \times 10^{-9}$  М·мин<sup>-1</sup> и  $2,8 \pm 0,29 \times 10^{-9}$  М·мин<sup>-1</sup>, соответственно, что свидетельствует об эффективности использования флавинов как низкомолекулярных моделей НАДФН-зависимой цитохром P450-редуктазы.

### **3.2.3. Переход от 2D к 3D режиму иммобилизации цитохромов P450 для повышения эффективности электрокатализа**

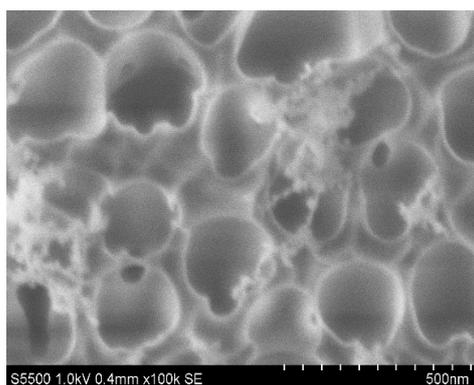
#### **3.2.3.1. Использование нанопорых ансамблей на основе нанопористого анодного оксида алюминия для иммобилизации цитохромов P450**

Включение фермента в ограниченные нанопространства может способствовать сохранению нативной конформации фермента и повышению эффективности электроферментативных каталитических реакций [107, 129-134, 167].

В качестве трехмерного нанопористого материала были использованы мембраны из анодного оксида алюминия, 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). Дизайн электрохимического эксперимента позволяет включить фермент в 3D-нанопоры на плоском электроде, осуществить 2D→3D переход матрицы и эффективно исследовать каталитическую активность CYP3A4. Главным преимуществом мембраны на основе анодного оксида алюминия является химическая стабильность, высокоорганизованная и регулярная структура нанопор, а также коммерческая доступность. На рис. 18 приведены изображения используемой мембраны с порами диаметром 0,1 мкм, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа. Мембрана имеет регулярное расположение пор для эффективного включения исследуемого белка. Средний размер мономеров цитохромов P450 лежит в нанометровом диапазоне [168], что позволяет предположить возможность включения белка в поры.



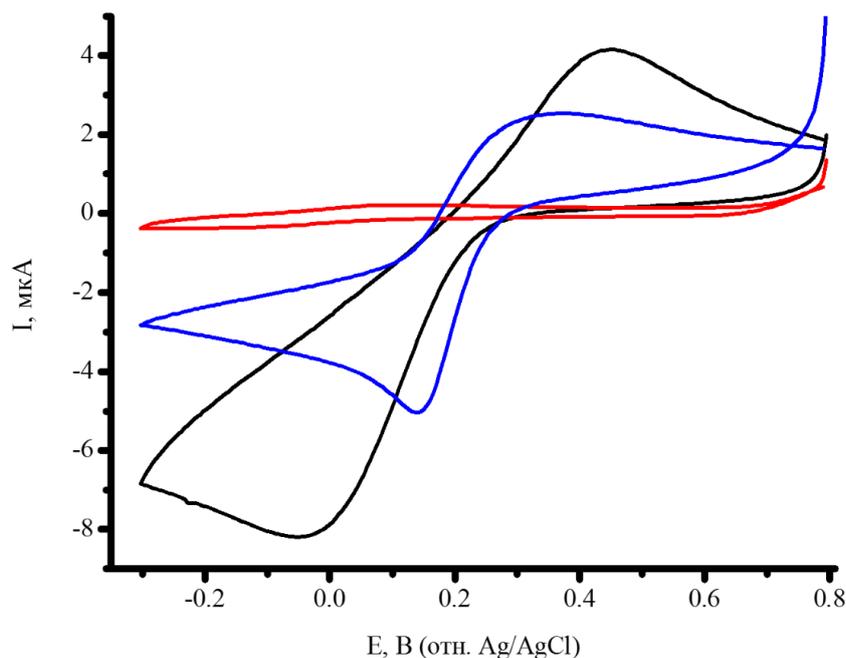
А



Б

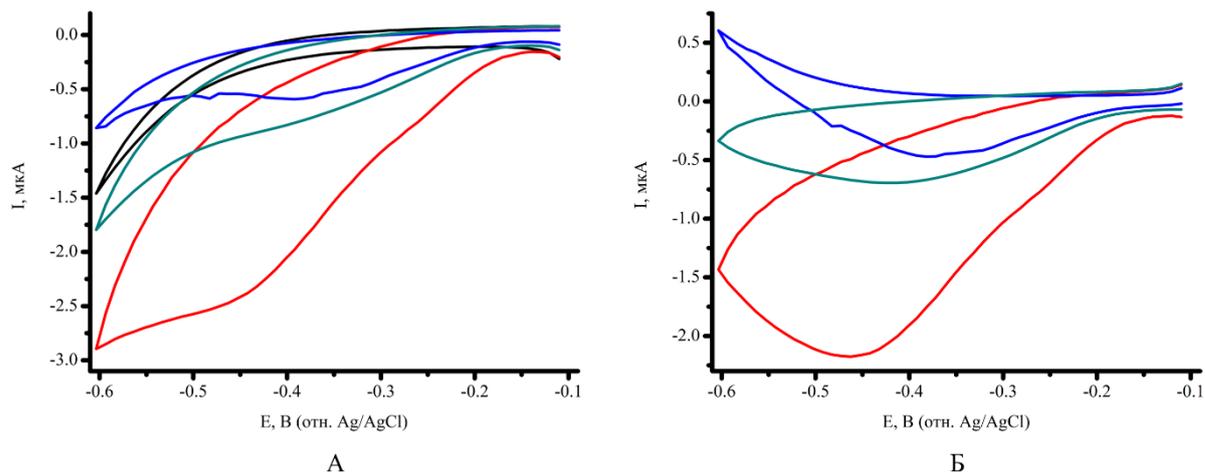
**Рисунок 18.** Микрофотографии пористой мембраны, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S 5500 при различных увеличениях.

В экспериментах по регистрации электрокаталитической активности СУРЗА4 использовали циклическую вольтамперометрию (ЦВА) и горизонтальный режим работы электродов. Электроактивная площадь ПГЭ и модифицированных электродов была рассчитана по уравнению Рэндлса-Шевчика [169, 170] с использованием внешнего электролита 5 мМ раствора гексацианоферрата калия. Было зарегистрировано увеличение электроактивной площади электрода при модификации мембранами из оксида алюминия (Anodisc 0,1 мкм) и ДДАБ по сравнению с немодифицированным электродом и электродом, модифицированным только ДДАБ (Рис. 19). Электроаналитические характеристики электродов, модифицированных мембранами из оксида алюминия (Anodisc 0,1 мкм) и ДДАБ продемонстрировали существенное увеличение электроактивной площади модифицированных электродов (в 2,5 и 103 раза, соответственно) по сравнению с немодифицированным электродом и электродом, модифицированным ДДАБ, что говорит об эффективности использования мембраны с порами субмикронного размера ( $0,0014 \text{ см}^2$ ,  $0,000034$  и  $0,0035 \text{ см}^2$  для ПГЭ, ПГЭ/ ДДАБ и ПГЭ/Anodisc 0,1 мкм/ ДДАБ, соответственно).



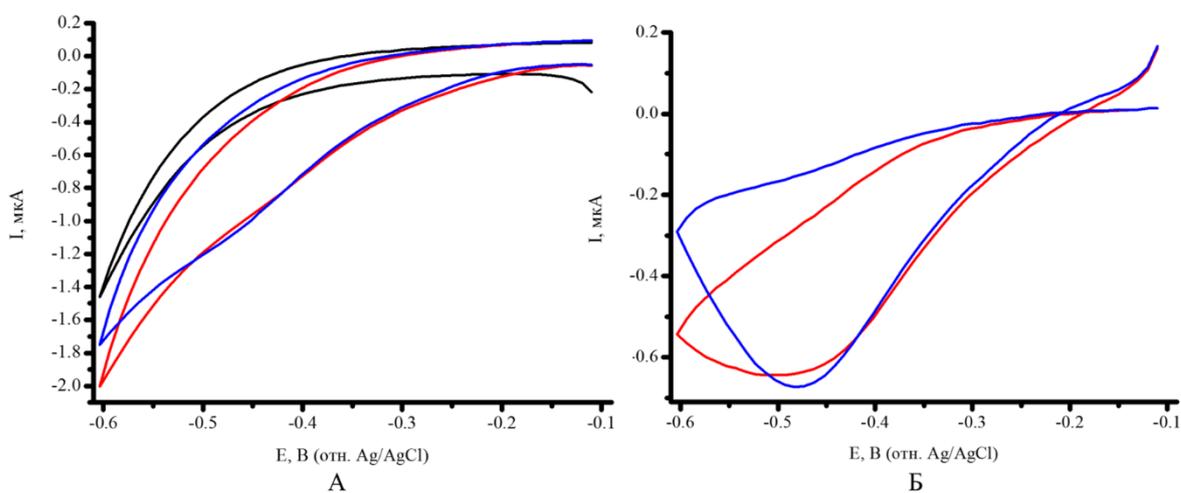
**Рисунок 19.** Циклические вольтамперограммы ПГЭ (черная линия), и ПГЭ/ДДАБ (красная линия) и ПГЭ/Anodisc 0,1 мкм/ ДДАБ (синяя линия) при скорости развертки потенциала 0,05 В/с. Измерения проводили в горизонтальном режиме, в 100 мкл 5 мМ раствора гексацианоферрата калия. Диапазон потенциалов от -0,1 до +0,8 В.

Электроды с иммобилизованными рекомбинантными изоформами цитохромов P450 являются эффективными инструментами при поиске новых субстратов, ингибиторов, активаторов этого класса гемопротеинов [58, 170-172]. В экспериментах по регистрации электрокаталитической активности СУР3А4 использовали циклическую вольтамперометрию (ЦВА) и горизонтальное расположение электродов. На рис. 20 А и 20 Б приведены сравнительные ЦВА СУР3А4 в диапазоне потенциалов от -0,1 до -0,6 В, демонстрирующие смещение потенциала восстановления гемопротеина при использовании пористой мембраны в анодную область потенциалов, что свидетельствует о термодинамически более выгодном процессе электрохимического восстановления иона железа гема СУР3А4. При вычитании фоновой ЦВА электрода без фермента (ПГЭ/ДДАБ) получены более четкие вольтамперограммы, также демонстрирующие смещение потенциала восстановления гемопротеина при использовании пористой мембраны в анодную область потенциалов СУР3А4 [124] в соответствии со схемой  $\text{Fe}^{3+} + \bar{e} \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+}\text{O}_2$  [6, 170, 172].



**Рисунок 20.** (А). Циклические вольтамперограммы фоновой кривой (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 (красная линия), ПГЭ/Anodisc 0,1 мкм/ДДАБ/СУР3А4 (синяя линия) и ПГЭ/Anodisc 0,2 мкм/ДДАБ/СУР3А4 (зеленая линия). (Б). Циклические вольтамперограммы СУР3А4, иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ (красная линия), ПГЭ/Anodisc 0,1 мкм/ДДАБ (синяя линия) и ПГЭ/Anodisc 0,2 мкм/ДДАБ (зеленая линия), полученные с вычитанием соответствующей фоновой кривой. Скорость сканирования 0,1 В/с.

Из циклических вольтамперограмм ПГЭ/Anodisc 0,1/ДДАБ/СУР3А4 представленных на рисунке 21 А следует, что при добавлении субстрата СУР3А4 – эритромицина каталитический ток увеличивается, это четко визуализируется при вычитании фоновой кривой на рисунке 21 Б.



**Рисунок 21.** (А) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/Anodisc 0,1 мкм/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/Anodisc 0,1 мкм/ДДАБ/СУР3А4 (красная линия) и ПГЭ/Anodisc 0,1

мкм/ДДАБ/СУР3А4 (синяя линия) в присутствии 100 мкМ эритромицина. (Б) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/Anodisc 0,1 мкм/ДДАБ/СУР3А4 (красная линия) и ПГЭ/Anodisc 0,1 мкм/ДДАБ/СУР3А4 (синяя линия) при добавлении 100 мкМ эритромицина после вычитания фоновой кривой. Скорость сканирования 0,1 Вс<sup>-1</sup>.

Эффективность электрокатализа оценивали по образованию продукта СУР3А4-зависимой реакции N-деметилирования эритромицина - формальдегида [149]. Как следует из таблицы 10, использование мембран из анодного оксида алюминия (Anodisc 0,1 мкм и 0,2 мкм) для модификации электрода позволяет сместить потенциал восстановления СУР3А4 и потенциал катализа эритромицина в анодную область, что способствует более эффективному процессу переноса электронов между электродом и активным центром фермента и делает его термодинамически более выгодным [7, 124]. Несмотря на меньшее количество регистрируемого электроактивного белка на ПГЭ/Anodisc 0,1/ДДАБ/СУР3А4, (параметр  $\Gamma_0$ , моль/см<sup>2</sup>), каталитическая активность такой системы составляет 232±4%. Этот эффект может отражать сохранение каталитической активности фермента в порах пространственно-упорядоченных структур на основе оксида алюминия.

**Таблица 10.** Электрохимические характеристики СУР3А4 с использованием электродов, модифицированных мембранами из оксида алюминия, содержащие регулярные нанопоры.

Электрод	$E_{red}$ , В	$E_{cat}$ , В	$\Gamma_0$ , моль/см <sup>2</sup>	$I_{cat}/I_{red}$	Относительная эффективность катализа, %
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4	-0,432 ±0,008	-0,450 ±0,005	3,94 ±0,69×10 <sup>-11</sup>	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 <sup>-12</sup>	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 <sup>-12</sup>	0,77±0,17	132±5

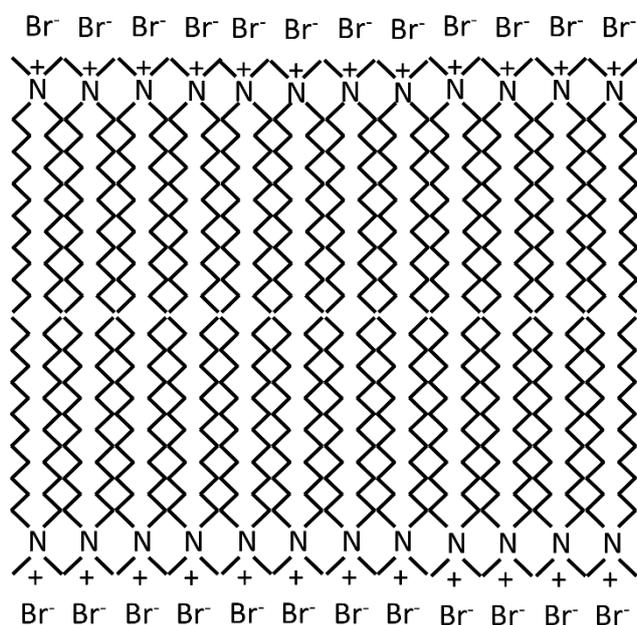
Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Включение фермента в поры анодного оксида алюминия с диаметром 0,1 и 0,2 мкм позволило повысить эффективность электрокатализа за счет перехода от двумерной поверхности планарного электрода к трехмерной объемной структуре рабочего электрода

с субмикронным диаметром пор. Таким образом, нами был разработан новый подход к повышению каталитической активности СУР3А4 с помощью модификации электродной поверхности, позволяющий перевести процесс переноса электронов в СУР3А4-электрохимических системах в термодинамически более выгодный режим и существенно увеличить (более, чем в 2 раза) каталитическую активность СУР3А4 в электрокаталитической реакции N-деметилования макролидного антибиотика эритромицина. Кинетические параметры электроферментативных реакций N-деметилования эритромицина зависят от размеров нанопор, при меньшем размере пор (0,1 мкм) наблюдались наиболее эффективные параметры катализа (таблица 10) [173].

### 3.2.3.2. Использование мембранного порообразующего белка стрептолизина O для создания на электроде нанопорового ансамбля для иммобилизации цитохрома P450

Цитохромы P450 млекопитающих относятся к мембранным белкам, поэтому использование для модификации электрода веществ, обладающих свойствами схожими со свойствами мембран, положительно сказывается на свойствах иммобилизованного белка. В качестве такого мембраноподобного вещества использовался ДДАБ, образующий на поверхности электрода бислоем (рис. 22) [174].

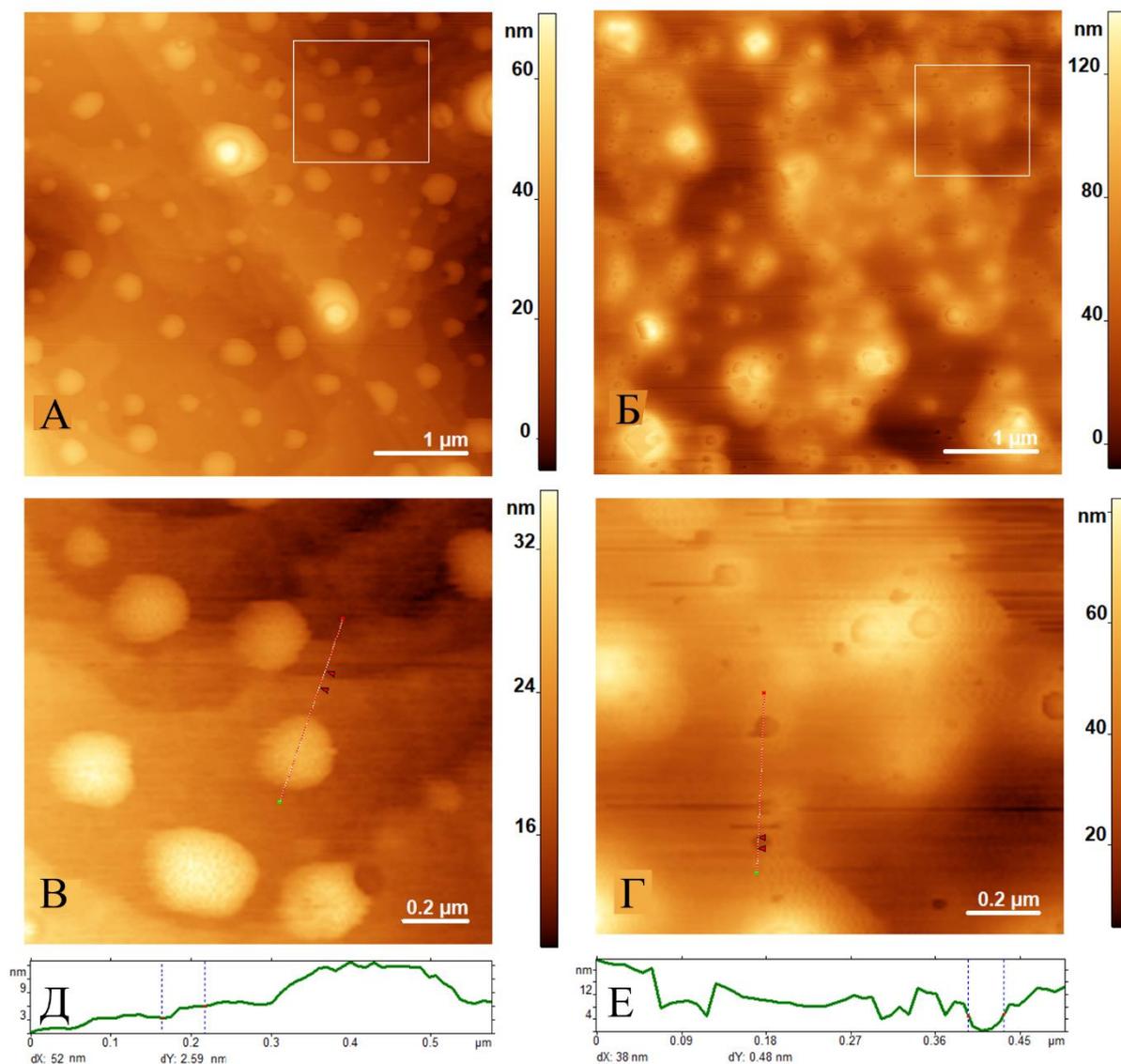


**Рисунок 22.** Схематическое изображение бислоя, образуемого ДДАБ  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}]_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{Br}^-)$  при модификации поверхности электрода.

Для создания на поверхности электрода, модифицированного синтетическим липидоподобным соединением ДДАБ, белковых пор, был использован порообразующий белок стрептолизин O (SLO). Стрептолизин O (SLO) - гликозилированный белок,

полученный из грамположительных бактерий *Streptococcus pyogenes* [175-177]. Данный метод модификации электрода обеспечивает переход от планарной 2D поверхности к более развитой 3D поверхности за счет образования углублений в бислое, образованном ДДАБ. Такой подход способствует более эффективной иммобилизации цитохрома Р450, так как шероховатость поверхности улучшает электрохимические свойства гемопroteина [137].

Для исследования топологии поверхности, образующейся при послойном нанесении ДДАБ и SLO на электрод, были получены изображения с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) (Рисунок 23).



**Рисунок 23.** (А) АСМ изображение ДДАБ в полуконтактном режиме. (Б) АСМ изображение ДДАБ/SLO в полуконтактном режиме. (В) Пятикратное приближение изображения ДДАБ. (Г) Пятикратное приближение изображения ДДАБ/SLO. (Д) Профиль высоты ДДАБ. (Е) Профиль высоты ДДАБ/SLO.

Полученные данные о топологии поверхности для пленки ДДАБ согласуются с данными, описанными в литературе [176, 177], толщина пленки составляет порядка 2-3 нм.

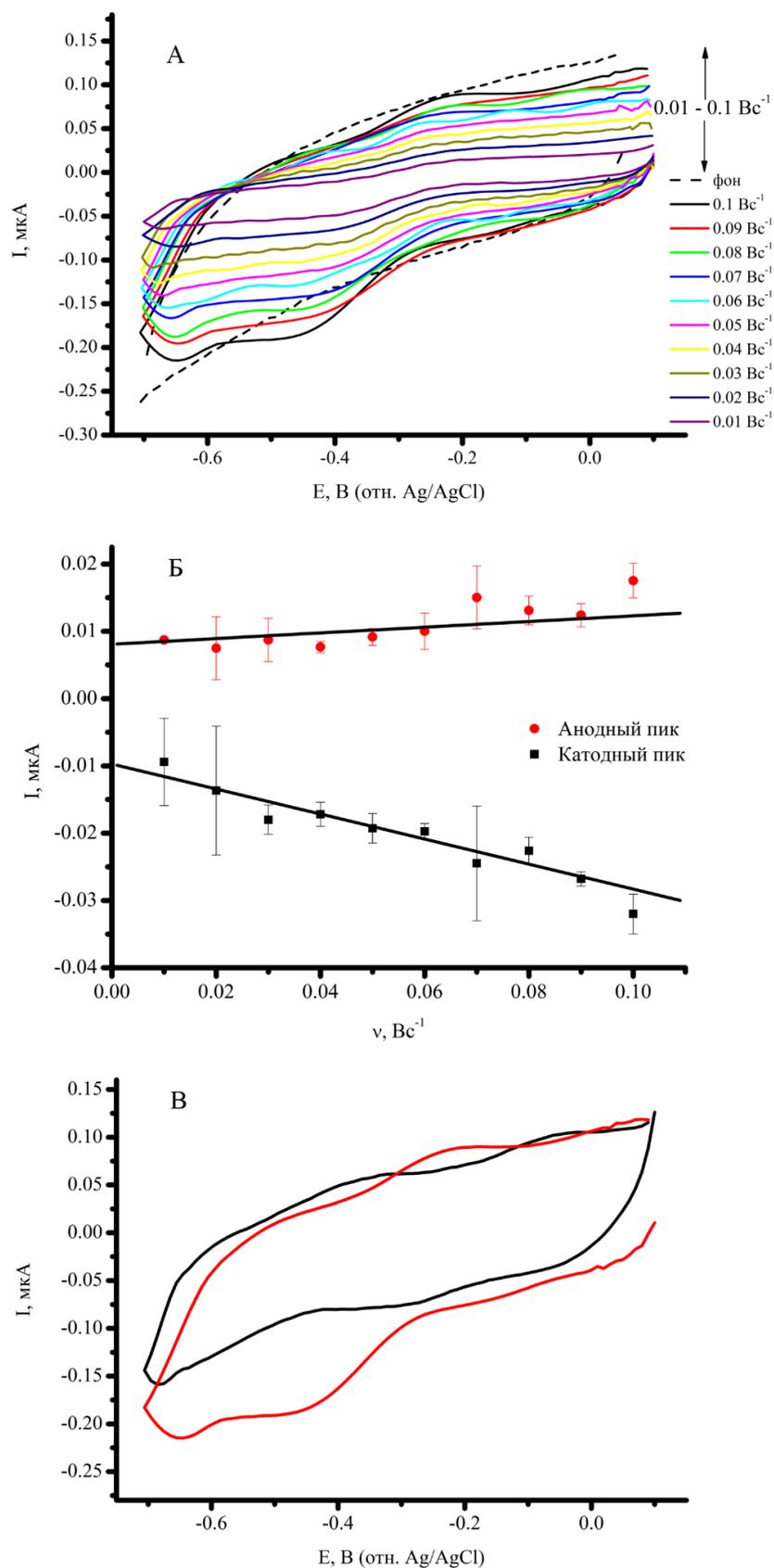
При нанесении на пленку ДДАБ раствора SLO наблюдалось увеличение неоднородности поверхности и образование полостей различного размера от 10 до 100 нм, глубина полученных пор составляла 4 нм, это превышает толщину бислоя, образованного только молекулами ДДАБ.

СУР3А4, иммобилизованный на ПГЭ, модифицированном ДДАБ и SLO (ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4) был охарактеризован с помощью циклических вольтамперограмм в анаэробных условиях. На вольтамперограммах, представленных на рисунке 24 А, в диапазоне потенциалов от 0,1 до -0,7 В при скоростях сканирования от 0,01 до 0,1 В/с регистрируются пики восстановления и окисления, характерные для обратимого процесса  $CYP-Fe^{3+} + e^- (с\ электрода) \rightleftharpoons CYP-Fe^{2+}$ , протекающем в активном центре фермента. Линейная зависимость максимальных амплитуд токов от скорости сканирования потенциала (рис. 24 Б), подтверждает предположение о том, что процесс протекает в адсорбционном режиме в тонкой пленке белка, и не является диффузионно-контролируемым. Полупотенциал ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4 составил  $E^0 = -0,325 \pm 0,024$  В, что является близким по значению к потенциалу, полученному для электродов, модифицированным только ДДАБ (ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4),  $E^0 = -0,302 \pm 0,010$  В. Полученные из циклических вольтамперограмм значения приведены в таблице 11.

**Таблица 11.** Электроаналитические параметры СУР3А4 иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ и ПГЭ/ДДАБ/SLO

Электрод	$E_c, В$	$E_a, В$	$E^0, В$	$\Delta E, В$	$k_s, с^{-1}$	$\Gamma_0,$ моль/см <sup>2</sup>
ПГЭ/ДДАБ/ СУР3А4	-0,377 $\pm 0,008$	-0,227 $\pm 0,010$	-0,302 $\pm 0,010$	-0,150 $\pm 0,009$	0,51 $\pm 0,030$	2,7 $\pm 0,2$ $\times 10^{-11}$
ПГЭ/ДДАБ/ SLO/ СУР3А4	-0,441 $\pm 0,016$	-0,209 $\pm 0,032$	-0,325 $\pm 0,024$	-0,230 $\pm 0,044$	0,203 $\pm 0,038$	1,75 $\pm 0,26$ $\times 10^{-11}$

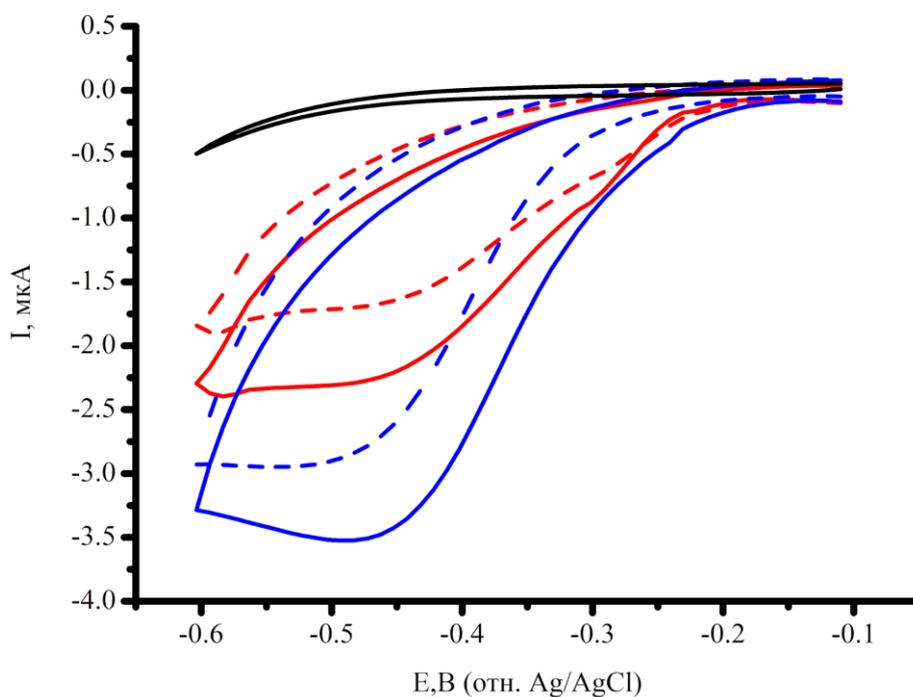
Представлены средние значения  $\pm$  стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.



**Рисунок 24.** (А) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4 в анаэробных условиях при различных скоростях сканирования. (Б) Зависимость токов

катодного и анодного пиков ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4 от скорости сканирования. (В) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 (черная линия) и ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4 (красная линия) при скорости сканирования 0,1 В/с. Перед измерениями через ячейку на протяжении 30 мин пропускали аргон, для достижения анаэробных условий.

Более развитая поверхность для иммобилизации, позволившая эффективно иммобилизовать фермент на электроде, дала возможность исследовать каталитические свойства СУР3А4 иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ/SLO в присутствии кислорода и субстрата эритромицина. На циклических вольтамперограммах, изображенных на рисунке 25, в аэробных условиях зарегистрирован пик восстановления СУР3А4 в присутствии кислорода, соответствующий реакции присоединения молекулы кислорода к атому железа гема  $Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{2+}O_2$ . 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 12.



**Рисунок 25.** Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 (красная прерывистая линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 в присутствии 100 мкМ эритромицина (красная линия), ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4 (синяя прерывистая линия), ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4 (синяя линия) в присутствии 100 мкМ эритромицина. Скорость сканирования 0,1 Вс<sup>-1</sup>.

**Таблица 12.** Электроаналитические параметры СУР3А4 иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ и ПГЭ/ДДАБ/SLO

Электрод	$E_{red}, В$	$E_{cat}, В$	$E_{onset}, В$	$I_{O_2}, А \times 10^{-7}$	$I_{Er}, А \times 10^{-7}$	$I_{Er}/I_{O_2}$	Чувствительность, нА мкМ <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>
ПГЭ/ДДАБ/ СУР3А4	-0,438 ±0,006	-0,438 ±0,006	-0,228 ±0,003	-3,71 ±0,51	-6,05 ±0,63	1,63 ±0,14	193 ±21
ПГЭ/ДДАБ/ SLO/ СУР3А4	-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

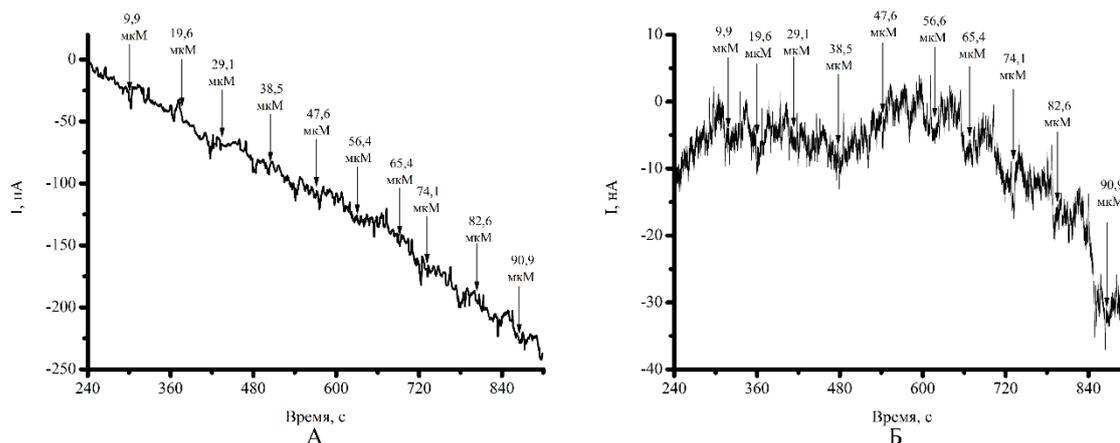
Представлены средние значения ± стандартные отклонения из не менее трёх независимых экспериментов.

Каталитический ток в системах ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 и ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4 регистрируется в присутствии субстратов кислорода и эритромицина, и повышается при использовании модификации со стрептолизином 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 поросодержащей поверхности для скрининга субстратных свойств и использования таких систем в качестве ферментных нанореакторов. Аналитическая чувствительность ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 и ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4 к эритромицину составляет  $193 \pm 21$  и  $389 \pm 45$  нА мкМ<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>, соответственно.

Каталитическая эффективность системы была исследована двумя методами – хроноамперометрическим титрованием и анализом образования продукта реакции.

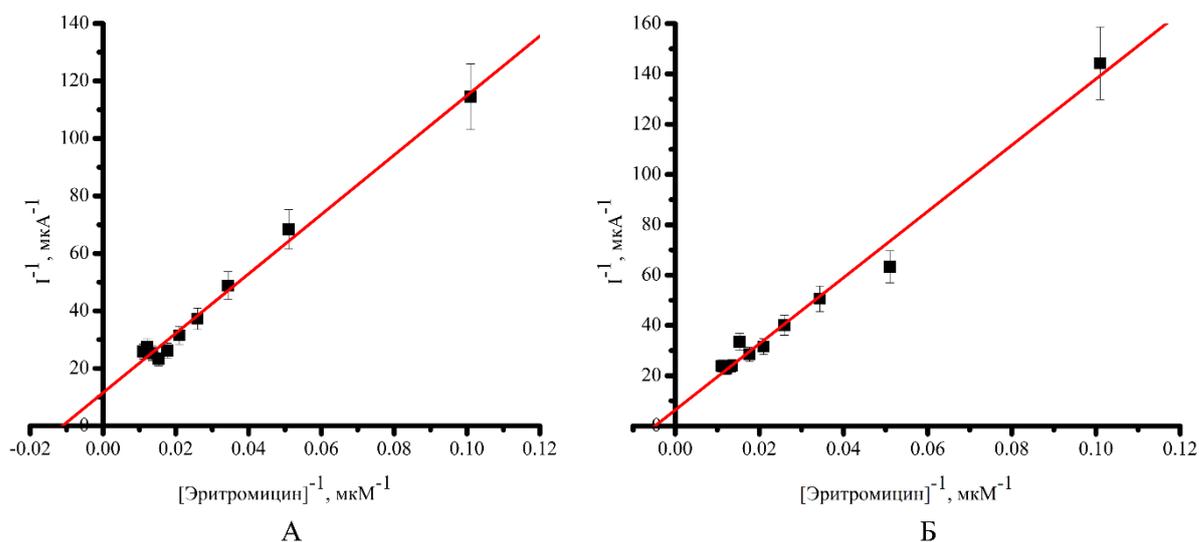
Титрование ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 и ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4 проводили 10 мМ раствором эритромицина в этаноле. Концентрация этанола в ячейке не превышала 1% по объему. Измерения проводили в 1 мл калий-фосфатного буфера при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,5 В (отн. Ag/AgCl).

Кинетические параметры СУР3А4, иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ и ПГЭ/ДДАБ/SLO, по отношению к эритромицину, определяли методом хроноамперометрии. На рисунках 26 А и 26 Б представлена зависимость каталитического тока восстановления СУР3А4 на ПГЭ/ДДАБ и ПГЭ/ДДАБ/SLO при добавлении субстрата – эритромицина.



**Рисунок 26.** (А) Хроноамперометрическое титрование ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 эритромицином. (Б) Хроноамперометрическое титрование ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4 эритромицином. Титрование проводили при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,5 В в аэробных условиях, 100 мМ раствором эритромицина в этаноле, концентрация этанола в ячейке не превышала 1% по объему.

Для определения кинетических параметров взаимодействия иммобилизованного фермента и субстрата, были построены зависимости в двойных обратных координатах ток, концентрация добавленного субстрата (рис. 27 А, Б). Для обработки результатов была использована линеаризация уравнения Михаэлиса-Ментен методом Лайнуивера-Берка, уравнение описано в разделе 3.2.2.2.



**Рисунок 27.** (А) График Лайнуивера-Берка для хроноамперометрического титрования ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 эритромицином. (Б) График Лайнуивера-Берка для хроноамперометрического титрования ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4 эритромицином.

Для определения эффективности конверсии субстрата эритромицина, был проведен электролиз при потенциале -0,5 В в течение 20 мин. Определение концентрации продукта осуществлялось по накоплению формальдегида спектрофотометрически. Кинетические параметры и эффективность каталитического процесса обобщены в таблице 13.

**Таблица 13.** Сравнительные параметры электрокаталитической реакции СУР3А4-зависимого N-деметилирования эритромицина

Электрод	$I_{cat\ max}, A$	$K_M^{app}, M$	$V_{max}, M \cdot мин^{-1}$
SPE/DDAB/СУР3А4	$8,69 \pm 0,94 \times 10^{-8}$	$8,98 \pm 1,2 \cdot \times 10^{-5}$	$1,52 \pm 0,34 \times 10^{-10}$
SPE/DDAB/SLO/СУР3А4	$15,8 \pm 1,7 \times 10^{-8}$	$20,7 \pm 2,5 \cdot \times 10^{-5}$	$4,52 \pm 0,33 \times 10^{-10}$

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

Кажущаяся константа Михаэлиса эритромицина для СУР3А4, иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ и ПГЭ/ДДАБ/SLO, была рассчитана как  $8,98 \pm 1,2 \times 10^{-5}$  М и  $20,7 \pm 2,5 \times 10^{-5}$  М, соответственно. Данные значения находятся в той же области что и результаты, полученные в других работах [78, 180]. Увеличение  $K_M^{app}$  для СУР3А4 иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ/SLO может объясняться затруднением диффузии субстрата к ферменту, расположенному в порах, образованных SLO, по сравнению с ферментом иммобилизованным на липидоподобной пленке, образованной ДДАБ.

Иммобилизация СУР3А4 с помощью липидоподобного вещества ДДАБ и мембранного белка стрептолизина О показала эффективность для изучения каталитических свойств СУР3А4 и способствовала существенному повышению скорости реакции N-деметилирования эритромицина ( $100 \pm 22\%$  и  $297 \pm 7\%$ , соответственно) [181].

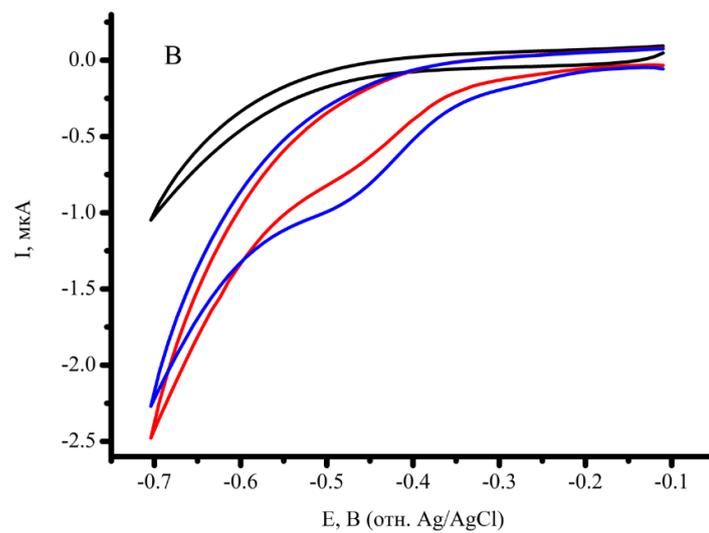
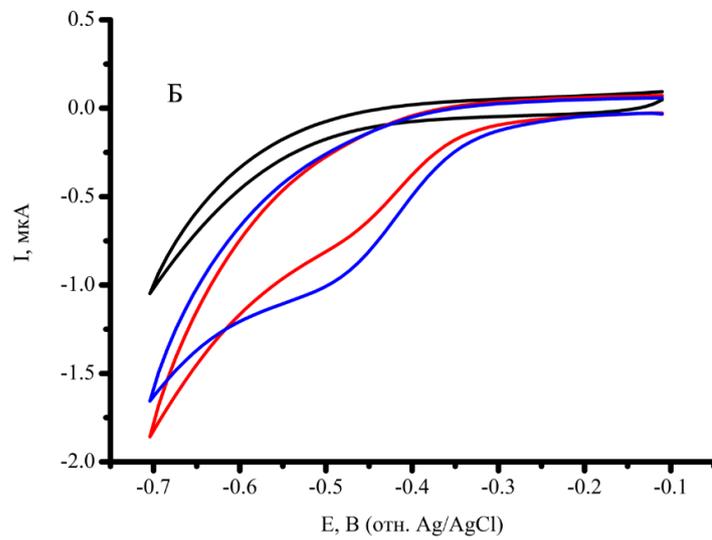
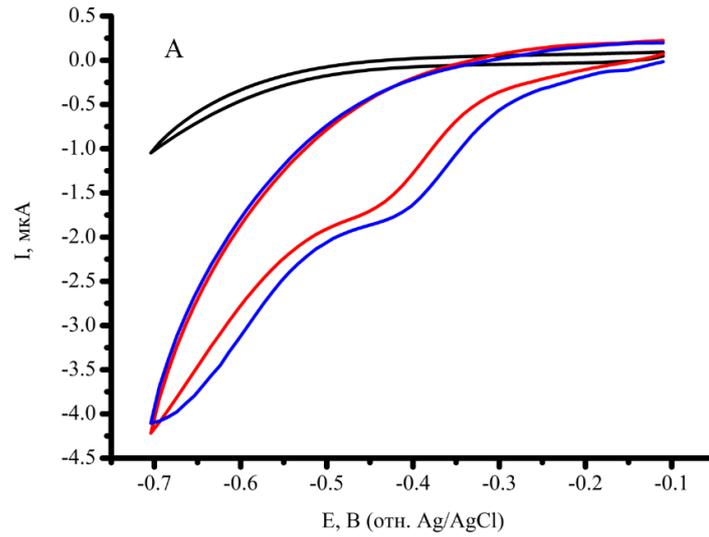
### 3.2.3.3. Анализ каталитической активности цитохрома Р450 3А4 в бактосомах

Использование микросом печени или их биотехнологических аналогов (бактосомы, супресомы, бакулосомы), позволяет эффективно исследовать каталитические характеристики цитохромов Р450 как в реконструированных [4], так и в электрохимических системах [135-140]. В таких структурах в мембранной оболочке кроме цитохрома Р450, заключено несколько белков редокс-партнеров цитохрома Р450, а именно, цитохром *b*<sub>5</sub>, и НАДФН – зависимая цитохром Р450 редуктаза (CPR).

Были исследованы электрохимические свойства бактосом, содержащих СУР3А4, цитохром *b*<sub>5</sub> и CPR (СУР3А4BR), иммобилизованных на печатном графитовом электроде,

модифицированном ДДАБ и ДДАБ/SLO. Также были исследованы электрокаталитические параметры взаимодействия с субстратами СYP3A4 эритромицином и диклофенаком.

Электроаналитические параметры бактосом, содержащих СYP3A4 (СYP3A4BR), иммобилизованных на ПГЭ/ДДАБ и ПГЭ/ДДАБ/SLO исследовали с помощью циклической вольтамперометрии в присутствии кислорода и 100 мкМ раствора субстрата (эритромицина или диклофенака), ЦВА представлены на рисунке 28 А, Б, В. На ЦВА в присутствии кислорода регистрируется широкий пик в области потенциалов  $-0,432 \pm 0,014$  В, соответствующий восстановлению гема СYP3A4, флавиновых кофакторов ФМН и ФАД в активном центре CPR, и гема цитохрома  $b_5$  [135, 136, 138–140, 142, 182]. В присутствии субстратов эритромицина или диклофенака наблюдается увеличение каталитического тока, что является характерической особенностью при взаимодействии цитохрома P450 с субстратом. Флавопротеины характеризуются потенциалом восстановления в более отрицательной области по сравнению с потенциалом восстановления иона железа гема [182].



**Рисунок 28.** (А) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВR в присутствии кислорода (красная линия) и

ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВR в присутствии 100 мкМ эритромицина и кислорода (синяя линия).  
 (Б) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ/SLO (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4ВR в присутствии кислорода (красная линия) и ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4ВR в присутствии 100 мкМ эритромицина и кислорода (синий).  
 (В) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВR в присутствии кислорода (красная линия) и ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВR в присутствии 100 мкМ диклофенака и кислорода (синяя линия).

Как следует из рис. 28А, в присутствии 100 мкМ эритромицина и кислорода ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВR потенциал катализа равен  $E_{cat} = -0,417$  В, и является смещенным в положительную область потенциалов по сравнению с ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4  $E_{cat} = -0,438$  В, что свидетельствует о термодинамически более выгодном процессе. Проведен сравнительный анализ СУР3А4ВR и СУР3А4 иммобилизованных на ПГЭ/ДДАБ. Результаты проведенных экспериментов приведены в таблице 14.

**Таблица 14.** Электрохимические параметры СУР3А4 и СУР3А4ВR, иммобилизованных на ПГЭ/ДДАБ и ПГЭ/ДДАБ/SLO.

Электрод	Субстрат	$E_{red}, В$	$E_{cat}, В$	$E_{onset}, В$	Аналитическая чувствительность, $А М^{-1}$	$I_{cat}/I_{O_2}$
ПГЭ/ДДАБ/ СУР3А4	Эритромицин	-0,438 $\pm 0,006$	-0,438 $\pm 0,006$	-0,228 $\pm 0,003$	$6,05 \times 10^{-3}$	1,63 $\pm 0,14$
	Диклофенак		-0,462 $\pm 0,001$	-0,210 $\pm 0,001$		4,35 $\times 10^{-3}$
ПГЭ/ДДАБ/ СУР3А4ВR	Эритромицин	-0,432 $\pm 0,014$	-0,417 $\pm 0,023$	-0,294 $\pm 0,006$	$2,81 \times 10^{-3}$	1,19 $\pm 0,17$
	Диклофенак		-0,469 $\pm 0,006$	-0,375 $\pm 0,005$		1,16 $\times 10^{-3}$

ПГЭ/ДДАБ/ SLO/ СУР3А4ВR	Эритромицин	-0,462 ±0,001	-0,475 ±0,005	-0,357 ±0,006	$2,44 \times 10^{-3}$	3,82 ±0,39
-------------------------------	-------------	------------------	------------------	------------------	-----------------------	---------------

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

Наибольшая аналитическая чувствительность равная  $6,05 \times 10^{-3} \text{ А М}^{-1}$ , наблюдается для ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 и эритромицина (Таблица 12). Диклофенак проявляет слабые субстратные свойства к СУР3А4. Данные экспериментальных исследований согласуются с данными, представленными в литературных источниках [147-149]. Согласно данным, представленным в литературе, константа Михаэлиса  $K_M$  для диклофенака равна  $78,9 \pm 10,2 \text{ мкМ}$  [183-185], а для эритромицина  $25 \pm 8 \text{ мкМ}$  [79], это объясняет большую чувствительность по отношению к эритромицину, по сравнению с диклофенаком. Для СУР3А4ВR получены меньшие значения аналитической чувствительности, это может объясняться затрудненной диффузией молекул субстрата через мембрану бактосом.

Индекс связывания для СУР3А4ВR 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 субстратов. Молярная масса эритромицина составляет  $733 \text{ г моль}^{-1}$  и значительно превышает молярную массу диклофенака  $297 \text{ г моль}^{-1}$ .

Для исследования влияния порообразующего белка стрептолизина О были проведены эксперименты по включению СУР3А4ВR в поры, образованные этим белком на пленке липидоподобного модификатора ДДАБ. Значение индекса связывания для ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВR составило  $3,82 \pm 0,39$  в случае субстрата эритромицина, что значительно превышало значение этого параметра для электродов, модифицированных только ДДАБ, равное  $1,19 \pm 0,17$  [186].

Электрокаталитические свойства систем ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВR, ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4ВR и ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 приведены в таблице 15. Для сравнения кинетических параметров была проведена нормализация по количеству электроактивного белка (моль/электрод). Каталитическая активность СУР3А4ВR превышает активность для СУР3А4, в реакции N-деметилирования эритромицина. Наилучший результат продемонстрировала система ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4ВR.

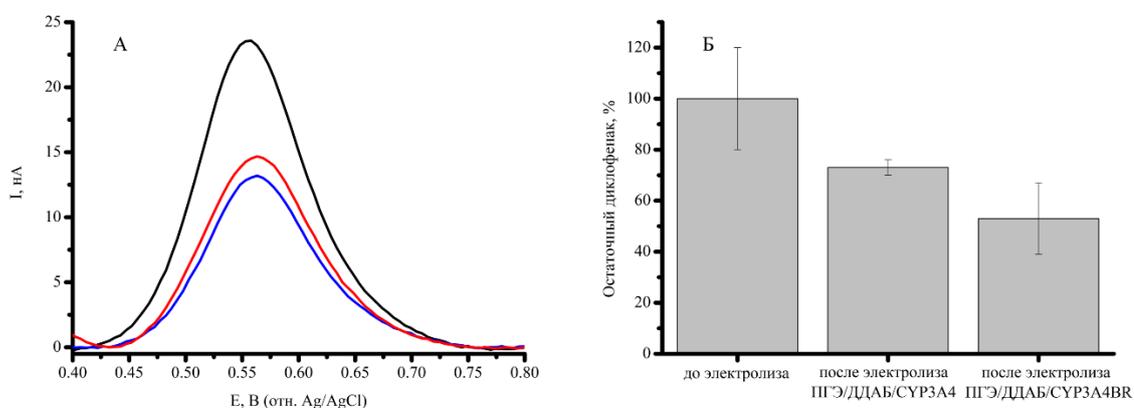
**Таблица 15.** Каталитические константы систем ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4, ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВR и ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4ВR.

Электрод	$k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup>
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4	0,28±0,06
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4BR	0,88±0,18
ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3А4BR	2,92 ± 0,23

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

Для анализа реакции 5-гидроксилирования диклофенака, была использована двухэлектродная схема регистрации каталитической активности [150]. После протекания реакции СУР3А4-зависимого электрокаталитического 5-гидроксилирования диклофенака, эффективность оценивали с помощью проведения реакции электроокисления диклофенака на немодифицированном ПГЭ при положительных значениях потенциала.

На рисунке 29 А изображены дифференциально-импульсные вольтамперограммы (ДИВА) электроокисления диклофенака на немодифицированном ПГЭ, интенсивность пика электроокисления диклофенака после электролиза снижается в обоих случаях, как ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4, так и ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4BR.



**Рисунок 29.** (А) Дифференциально импульсная вольтамперограмма 100 мкМ диклофенака до электролиза (черная линия), и после электролиза при потенциале -0,55 В, в течение 20 мин, на ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 (красная линия), ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4BR (синяя линия). (Б) Относительная концентрация диклофенака до и после электролиза, катализируемого СУР3А4 и СУР3А4BR.

В таблице 16 обобщены электрокаталитические параметры систем ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 и ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4BR. Показано, что в случае иммобилизации бактосом СУР3А4BR, эффективность электрокатализа выше, чем в случае иммобилизации рекомбинантного препарата СУР3А4.

**Таблица 16.** Электрокаталитические свойства ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВR в сравнении с ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 в реакции СУР3А4-зависимого гидроксирования диклофенака при потенциале -0,55 В, в течение 20 мин.

Электрод	I(диклофенак), нА*	Процент оставшегося диклофенака , %**	V <sub>max</sub> , Ммин <sup>-1</sup>	k <sub>cat</sub> , мин <sup>-1</sup>
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4	15,05±0,5	72,5±2,4	1,375±0,12× 10 <sup>-6</sup>	4,98±0,48
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4ВR	11,03±3,1	53,2±7,4	2,34±0,37×1 0 <sup>-6</sup>	17,59±2,73

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

\*I(диклофенак) – ток электроокисления диклофенака

\*\*Расчитано из тока электроокисления диклофенака до электролиза I(диклофенак) = 20,75 ±4,17 нА (100%).

Полученное значение каталитической константы сравнимо с данными, представленными в литературе k<sub>cat</sub> 13,2 мин<sup>-1</sup> [185]. С точки зрения создания биореактора, бактосомы проявили большую эффективность чем рекомбинантный фермент [72, 187].

## 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-деметилирования 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 *b<sub>5</sub>*. 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 P450 для исследования межлекарственных взаимодействий. Проведено *in vitro* моделирование антихеликобактерной терапии лекарственными препаратами, метаболизируемыми цитохромом P450 3A4. Показано, что макролидный антибиотик эритромицин не оказывает существенного влияния на цитохромом P450 3A4-зависимую биотрансформацию омепразола, в то время как омепразол, снижает скорость цитохром P450 3A4-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 P450 с флавинами увеличивает скорость электрохимической цитохром P450 3A4-зависимой биотрансформации эритромицина. Нековалентный комплекс P450 3A4 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<sup>-1</sup> (в  $2 \pm 0,6$  раза). При образовании нековалентного комплекса P450 2C9 с ФАД максимальная скорость каталитической реакции  $V_{\max}$  возрастает с  $1,89 \pm 0,21 \times 10^{-9}$  Ммин<sup>-1</sup> до  $2,8 \pm 0,29 \times 10^{-9}$  Ммин<sup>-1</sup> (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 P450. 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 O 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<sup>-1</sup> (в  $2,97 \pm 0,07$  раз).
5. Бактосомы, содержащие цитохром P450 3A4 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<sup>-1</sup> (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<sup>-1</sup> (в  $3,53 \pm 0,88$  раз).

## Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность за постановку цели и помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы научному руководителю, заведующей лабораторией биоэлектрохимии ИБМХ, д.б.н. Виктории Васильевне Шумянцевой, а также сотрудникам лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ.

Автор выражает искреннюю благодарность за проведение масс-спектрометрического анализа научному сотруднику лаборатории системной биологии ИБМХ Марии Геннадьевне Завьяловой.

Автор выражает глубокую признательность за предоставление препаратов рекомбинантных изоферментов цитохрома P450 сотруднику Государственного научного учреждения «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» города Минск республики Беларусь к.х.н. Гилепу Андрею Александровичу.

Автор выражает искреннюю признательность за получение микрофотографий поверхности ведущему инженеру лаборатории исследований единичных макромолекул ИБМХ Канашенко Сергею Леонидовичу.

Автор выражает искреннюю признательность за изучение топологии поверхности научному сотруднику Научного центра мирового уровня «Цифровой дизайн и персонализированное здравоохранение» ИБМХ Краевскому Сергею Владимировичу.

## Список использованных сокращений

[R] – концентрация субстрата (M)

Ag/AgCl – хлорид серебряный электрод

BMR - цитохром P450 102A1 бактерии *Bacillus megaterium*

CHAPS - 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат

CYP – цитохром P450

CYP101 - семейство цитохромов P450 101

CYP102A1 - цитохром P450 102A1

CYP11 – семейство цитохромов P450 11

CYP152 - семейство цитохромов P450 152

CYP2C19- цитохром P450 2C19

CYP2C9 - цитохром P450 2C9

CYP2D6- цитохром P450 2D6

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 (A)

$I_{catmax}$  – максимальный каталитический ток при насыщающей концентрации субстрата (A)

$I_{red}$  – ток восстановления цитохрома

FLD - флаводоксина

$K_M$  – константа Михаэлиса

$K_M^{app}$  – кажущаяся константа Михаэлиса

$k_s$  – гетерогенная константа скорости переноса электронов

$m/z$  – отношение массы иона к заряду

PDB - Protein Data Bank

SLO - стрептолизин O

АБТС - 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота)

АСМ - атомно-силовая микроскопия

АФК – активные формы кислорода

ДДАБ – дидодецилдиметиламмоний бромид

МЛВ – межлекарственные взаимодействия

НАД - никотинамидадениндинуклеотид

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

отн. – относительно

ПАУ - полициклические ароматические углеводороды

ПГЭ – печатный графитовый электрод

ФАД - флавинадениндинуклеотид

ФМН - флавинмононуклеотид

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

## Список использованной литературы

1. Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry // edited by Ortiz de Montellano P.R. – 4th edition. – Springer International Publishing Switzerland 2015. – 912 p.
2. Wanders R.J.A., Komen J. Kemp S. Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans // *The FEBS Journal* – 2011 – V. 278. – Iss. 2. – P. 182-194.
3. McSorley L. C., Daly A. K. Identification of human cytochrome P450 isoforms that contribute to all-trans-retinoic acid 4-hydroxylation// *Biochemical Pharmacology* – 2000 - V. 60 – Iss. 4 - P. 517–526.
4. Haduch A., Bromek E., Sadakierska-Chudy A., Wójcikowski J., Daniel W. A. The catalytic competence of cytochrome P450 in the synthesis of serotonin from 5-methoxytryptamine in the brain: An in vitro study// *Pharmacological Research* – 2013 – Vol. 67 – Iss. 1 – P. 53-59.
5. Hara Y., Nagaoka S. Pravastatin (Pravachol, Mevalotin) // *Drug Discovery in Japan* / edited by Nagaoka S. - Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2019. – Ch.3. - P. 35 – 49.
6. Guengerich F.P. Human Cytochrome P450 Enzymes // *Cytochrome P450. Structure, mechanism, and biochemistry* / edited by Ortiz de Montellano P.R. – 4th edition. – Springer International Publishing Switzerland, 2015. – Part II, V. 2, Ch. 9. – P. 523-786.
7. Schneider E., Clark D.S. Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors//*Biosensors and Bioelectronics*. – 2013. – Vol. 39.– P. 1-13.
8. Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R.; Gotoh Os., Coon M.J.; Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature / *Pharmacogenetics* – 1996 – V. 6 – Iss. 1. – P. 1–42.
9. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes // *Archives of Biochemistry and Biophysics* – 1958 –V. 75 – P. 376-386.
10. Omura T., Sato R. A New Cytochrome in Liver Microsomes // *The Journal of Biological Chemistry* – 1962 –V. 234 P. 1375-1376.
11. Omura T., Sato R. Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature // *The Journal of Biological Chemistry* – 1964 -V. 239 – Iss. 7 – P. 2370-2378.
12. Omura T., Sato R. Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes II. Solubilization, Purification, and Properties // *The Journal of Biological Chemistry* – 1964 – V. 239 – Iss. 7. – P. 2379-2385.

13. Schiffer L., Barnard L., Baranowski E.S., Gilligan L.C., Taylor A.E., Arlt W., Shackleton C.H.L., Storbeck K.-H. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review// *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2019 – V. 194 – P. 105439.
14. Gibbons G.F. The role of cytochrome P450 in the regulation of cholesterol biosynthesis// *Lipids* – 2002 – V. 37 – P. 1163–1170.
15. Zhang Y.-Y., Yang L. Interactions between human cytochrome P450 enzymes and steroids: physiological and pharmacological implications // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* – 2009 – V. 5 – Iss. 6 – P. 621–629.
16. Oliw E. H., Guengerich F. P., Oates J. A. Oxygenation of arachidonic acid by hepatic monooxygenases. Isolation and metabolism of four epoxide intermediates // *J. Biol. Chem.* – 1982 – V. 257 – Iss. 7 – P. 3771-3781.
17. Zanger U. M., Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation // *Pharmacol. Ther.* – 2013 – V. 138 – Iss.1 – P. 103-141.
18. Crettol S., Petrovic N., Murray M. Pharmacogenetics of Phase I and Phase II Drug Metabolism // *Curr. Pharm. Des.* – 2010 – V. 16 – Iss. 2 – P. 204–219.
19. Sono M., Roach M. P., Coulter E. D., Dawson J. H. Heme-Containing Oxygenases // *Chem. Rev.* – 1996 – V. 96 – Iss. 7 – P. 2841-2887.
20. Teft W.A., Gong I.Y., Dingle B. et al. CYP3A4 and seasonal variation in vitamin D status in addition to CYP2D6 contribute to therapeutic endoxifen level during tamoxifen therapy// *Breast Cancer Res Treat* - 2013 – V. 139 – P. 95–105.
21. Lamb D.C., Waterman M.R. Unusual properties of the cytochrome P450 superfamily // *Phil Trans R Soc B* – 2013 – V. 368 – Iss. 1612 – P. 20120434.
22. Rittle J., Green M. T. Cytochrome P450 Compound I: Capture, Characterization, and C-H Bond Activation Kinetics // *Science* - 2010. – V. 330 – Iss. 6006 – P. 933–937.
23. Waskell L., Kim J.-J. P. Electron transfer partners of cytochrome P450 // *Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry* / edited by P. R. Ortiz de Montellano. – 4th edition. – Springer International Publishing Switzerland, 2015. – Part I. - V. 1. - Ch. 2. – P. 33-68.
24. Im S.-C., Waskell L. The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b5 // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2011. – V. 507 – Iss. 1 – P. 144-153.
25. Zhang H., Im S.-C., Waskell L. Cytochrome b5 Increases the Rate of Product Formation by Cytochrome P450 2B4 and Competes with Cytochrome P450 Reductase for a Binding Site on Cytochrome P450 2B4\* // *J. Biol. Chem.* – 2007 – V. 282 – Iss. 41 – P. 29766-29776.

26. Hannemann F., Bichet A., Ewen K. M., Bernhardt R. Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2007 – V. 1770 – Iss. 3 – P. 330–344.
27. Lambeth, J. D. Enzymology of Mitochondrial Side-Chain Cleavage by Cytochrome P-450<sub>scc</sub> // *Molecular mechanisms of adrenal steroidogenesis and aspects of regulation and application* / edited by Ruckpaul K., Rein H. - Berlin, Boston: De Gruyter, 1990, - Ch. 2 -P. 58-100.
28. Atkins W. M., Sligar S. G. The roles of active site hydrogen bonding in cytochrome P-450<sub>cam</sub> as revealed by site-directed mutagenesis // *J. Biol. Chem.* – 1988 – V. 263 – Iss. 35 – P. 18842-18849.
29. Narhi L. O., Fulco A. J. Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium* // *J. Biol. Chem.* – 1986 – V. 261 – Iss. 16 – P. 7160–7169.
30. Denisov I.G., Makris T.M., Sligar S.G., Schlichting I. Structure and chemistry of cytochrome P450 // *Chem. Rev.* - 2005 – V. 105 – Iss. 6 – P. 2253-2278.
31. Katagiri M., Ganguli B. N., Gunsalus I. C. A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation // *J. Biol. Chem.* – 1968 – V. 243 – Iss. 12 – P. 3543-3546.
32. Hedegaard J., Gunsalus I. C. Mixed function oxidation: IV. An induced methylene hydroxylase in camphor oxidation // *J. Biol. Chem.* – 1965 – V. 240. – Iss. 10 – P. 4038-4043.
33. Conrad H. E., Lieb K., Gunsalus I.C. Mixed function oxidation: III. An electron transport complex in camphor ketolactonization // *J. Biol. Chem.* – 1965 – V. 240 – Iss. 10 –P. 4029-4037.
34. Estabrook R.W., Hildebrandt A., Baron J., Netter K. J., Leibman K. A new spectral species associated with cytochrome P-450 in liver microsomes // *Chem.-Biol. Interact.* - 1971 – V. 3 – Iss.4 – P. 260–261.
35. Guengerich F.P., Johnson W.W. Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems // *Biochemistry* - 1997 – V. 36 – Iss. 48 – P. 14741-14750.
36. Bernhardt R. Cytochrome P450: structure, function and generation of reactive oxygen species // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* - 1996 – V. 127 – P. 137-221.
37. Hrycay E.G., Bandiera S.M. Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Reaction Mechanisms of Cytochrome P450 Enzymes / edited by Hrycay, E., Bandiera, S. Springer, Cham. 2015. – V. 851. – p.61.
38. Bernhardt R., Urlacher V.B. Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2014 –V. 98 – Iss. 14 – P. 6185–6203.

39. Kumar S. Engineering cytochrome P450 biocatalysts for biotechnology, medicine and bioremediation // *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* – 2010 – V.6 – Iss. 2 – P. 115–131.
40. Venkatakrishnan K., von Moltke L.L., Greenblatt D.J. Human Drug Metabolism and the Cytochromes P450: Application and Relevance of In Vitro Models // *J. Clin. Pharmacol.* – 2001 – V. 41 – Iss. 11 – P. 1149-1179.
41. Baj-Rossi C., De Micheli G., Carrara S. P450-Based Nano-Bio-Sensors for Personalized Medicine // *Biosensors - Emerging Materials and Applications* / edited by Serra P.A. - InTech, London, 2011.
42. Joseph S., Rusling J.F., Lvov Y.M., Friedberg T., Fuhr U. An amperometric biosensor with human CYP3A4 as a novel drug screening tool // *Biochem. Pharmacol.* – 2003 - V. 65 – Iss. 11 – P. 1817-1826.
43. Sara E. Rosenbaum *Basic Pharmacokinetics and Pharmacodynamics //An Integrated Textbook and Computer Simulations* - John Wiley & Sons, 2016 –p. 576
44. Guengerich F.P. Oxidation of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol by human liver cytochrome P-450 // *Mol.Pharmacol.* –1988 –V.33 – Iss. 5 – P. 500-508.
45. Bolt H.M., Bolt M., Kappus H. Interaction of rifampicin treatment with pharmacokinetics and of ethinyloestradiol in man // *Acta Endocrinol.* –1977 - V. 85 – Iss. 1 – P. 189-197.
46. Schwarz U.I., Buschel B., Kirch W. Unwanted pregnancy on self-medication with St John's wort despite hormonal contraception // *Br. J. Clin.Pharmacol.* – 2003 – V. 55 – Iss. 1 – P. 112-113.
47. H. Bisswanger. *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*/ edited by Bisswanger H. – second edition. - Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008 – Ch. 2.5. – P. 80- 107.
48. Renwick A. G. The metabolism of antihistamines and drug interactions: the role of cytochrome P450 enzymes // *Clinical & Experimental Allergy.* – 1999 – V. 29 – P. 116–124.
49. Shoieb S.M., El-Sherbeni A.A., El-Kadi A.O.S. Identification of 19-(S/R)Hydroxyeicosatetraenoic Acid as the First Endogenous Noncompetitive Inhibitor of Cytochrome P450 1B1 with Enantioselective Activity // *Drug Metabolism and Disposition.* – 2019 –V. 47 – Is. 2. –P. 67-70.
50. Bao S.-S., Wen J., Zheng X., Zhou Q., Qu G.-E., Chen M.-J., Hu G.-X. Evaluation of the inhibition effects of apatinib on human and rat cytochrome P450 // *Toxicology Letters.* – 2018 – V. 297 – P. 1-7.
51. Fretland D.J., Djuric S.W. 12(R)- and 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acids: chemistry, biology, and pharmacology // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* –1989 – V. 38 – Iss. 4 – P. 215-228.

52. Moreno J.J. New aspects of the role of hydroxyeicosatetraenoic acids in cell growth and cancer development // *BiochemPharmacol.* – 2009 – V.77 – Iss. 1 – P. 1-10.
53. Chacos N., Falck J.R., Wixtrom C., Capdevila J. Novel epoxides formed during the liver cytochrome P-450 oxidation of arachidonic acid // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1982 – V. 104 – Iss. 3 – P. 916-922.
54. Deodhar M., Al Rihani S. B., Arwood M. J., Darakjian L., Dow P., Turgeon J., Michaud V. Mechanisms of CYP450 Inhibition: Understanding Drug-Drug Interactions Due to Mechanism-Based Inhibition in Clinical Practice // *Pharmaceutics.* – 2020 – V. 12 –P. 846.
55. Zhou S., Yung Chan S., Cher Goh B., Chan E., Duan W., Huang M., McLeod H. L. Mechanism-Based Inhibition of Cytochrome P450 3A4 by Therapeutic Drugs // *Clinical Pharmacokinetics,* - 2005 – V. 44 – Iss.3 – P. 279–304.
56. Feng S., He X. Mechanism-based Inhibition of CYP450: An Indicator of Drug-induced Hepatotoxicity // *Current Drug Metabolism.* – 2013 – V. 14 – Iss. 9. – P. 921–945. doi:10.2174/138920021131400114
57. Arınç E. The role of polymorphic cytochrome P450 enzymes in drug design, development and drug interactions with a special emphasis on phenotyping // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* – 2010 – V. 64 – Iss. 3–4 – P. 120-122.
58. Panicco, P. Castrignanò S., Sadeghi S.J., Di Nardo G., Gilardi G. Engineered human CYP2C9 and its main polymorphic variants for bioelectrochemical measurements of catalytic response // *Bioelectrochemistry* – 2021 – V. 38 – 107729.
59. Calabresi L., Pazzucconi F., Ferrara S., di Paolo A., Del Tacca M., Sirtori C. Pharmacokinetic interactions between omeprazole/pantoprazole and clarithromycin in healthy volunteers // *Pharmacological Research.* – 2004 – V. 49 – Iss. 5 – P. 493-499.
60. Dutreix C., Munarini F., Lorenzo S., Roesel J. Investigation into CYP3A4-mediated drug–drug interactions on midostaurin in healthy volunteers // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2013 – Vol. 72 – P.1223–1234.
61. Björkhem-Bergman L., Bäckström T., Nylén H., Rönquist-Nii Y., Bredberg E., Andersson T.B., Bertilsson L., Diczfalusy U. Comparison of endogenous 4 $\beta$ -hydroxycholesterol with midazolam as markers for CYP3A4 induction by rifampicin // *Drug Metab Dispos.* – 2013 – V. 41 – P. 1488–1493.
62. Makhova A.A., Shikh E.V., Bulko T.V., Sizova Z.M., Shumyantseva V.V., The influence of taurine and L-carnitine on 6  $\beta$ -hydroxycortisol/cortisol ratio in human urine of healthy volunteers // *Drug Metabolism and Personalized Therapy* – 2019 – V. 34 – Iss. 3 – 20190013.

63. Yu A.M., Idle J.R., Herraiz T., Kupfer A., Gonzalez F.J. Screening for endogenous substrates reveals that CYP2D6 is a 5-methoxyindolethylamine O-demethylase // *Pharmacogenetics*. – 2003 – V. 13 – Iss. 6 – P. 307–319.
64. Jiang X.L., Shen H.W., Yu A.M. Pinoline may be used as a probe for CYP2D6 activity // *Drug Metabol. Dispos.* – 2009 – V. 37 – Iss. 3 – P. 443–446.
65. Hiroi T., Kishimoto W., Chow T., Imaoka S., Igarashi T., Funae Y. Progesterone oxidation by cytochrome P450 2D isoforms in the brain // *Endocrinology*. – 2001 – V. 142 – Iss. 9 – P. 3901–3908.
66. Snider N.T., Sikora M.J., Sridar C., Feuerstein T.J., Rae J.M., Hollenberg P.F. The endocannabinoid anandamide is a substrate for the human polymorphic cytochrome P450 2D6 // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2008 – V. 327 – Iss. 2 – P. 538–545.
67. Leeder J.S., Gaedigk A., Wright K.J., Staggs V.S., Soden S.E., Lin Y.S., Pearce R.E. A longitudinal study of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) activity during adolescence // *Clin Transl Sci.* – 2022 – V. 15 – Iss. 10. – P. 2514-2527.
68. Boyer E. W. Dextromethorphan Abuse // *Pediatric Emergency Care*. – 2004 – V. 20. – Iss. 12 – P. 858–863.
69. Tay-Sontheimer J., Shireman L. M., Beyer R. P., Senn T., Witten D., Pearce R. E., Gaedigk A., Fomban C.L.G., Lutz J.D., Isoherranen N., Thummel K.E., Fiehn O., Leeder J.S., Lin Y. S. (). Detection of an endogenous urinary biomarker associated with CYP2D6 activity using global metabolomics // *Pharmacogenomics*, 2014 – V.15 – Iss. 16 – P. 1947–1962.
70. Арчаков А.И. Микросомальное окисление: Монография. – М.: Наука, 1975. – 327 с.
71. Luong T.-L. T., McNulty M. J., Evers D. L., Reinhardt B. J., Weina P. J. Pre-clinical drug-drug interaction (DDI) of gefitinib or erlotinib with Cytochrome P450 (CYP) inhibiting drugs, fluoxetine and/or losartan // *Current Research in Toxicology* - 2021– V. 2 - P. 217-224.
72. Baj-Rossi C., Rezzonico Jost T., Cavallini A., Grassi F., De Micheli G., Carrara S. Continuous monitoring of Naproxen by a cytochrome P450-based electrochemical sensor // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2014. – Vol. 53. – P. 283-287.
73. Kamble S. H., Sharma A., King T. I., Berthold E. C., León F., Meyer P. K. L., Kanumuri S. R. R., McMahon L. R., McCurdy C. R., Avery B. A. Exploration of cytochrome P450 inhibition mediated drug-drug interaction potential of kratom alkaloids // *Toxicology Letters* – 2020 – V. 319 – P. 148-154.
74. Liu S., Wang Z., Chan E., Zhao Y., Kang J., Zhang X., Tian X. Inhibition of cytochrome P450 enzymes and uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferases by vicagrel in human liver microsomes: A prediction of potential drug-drug interactions // *Chemico-Biological Interactions* – 2022 – V. 352 – 109775.

75. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Archakov A.I. Electrochemical reduction of cytochrome P450 as an approach to the construction of biosensors and bioreactors // *Journal of Inorganic Biochemistry* - 2005 – V. 99 – Iss. 5 – P.1051-1063.
76. Fantuzzi A., Mak L. H., Capria E., Dodhia V., Panicco P., Collins S., Gilardi G. A New Standardized Electrochemical Array for Drug Metabolic Profiling with Human Cytochromes P450 // *Analytical Chemistry*. – 2011 – V. 83 – Iss. 10 – P. 3831–3839.
77. Castrignanò S., Ortolani A., Sadeghi S.J., Di Nardo G., Allegra P., Gilardi G. Electrochemical Detection of Human Cytochrome P450 2A6 Inhibition: A Step toward Reducing Dependence on Smoking // *Analytical Chemistry* - 2014 – V. 86 – Iss. 5 – P. 2760–2766.
78. Sadeghi S. J., Ferrero S., Di Nardo G., Gilardi G. Drug–drug interactions and cooperative effects detected in electrochemically driven human cytochrome P450 3A4 // *Bioelectrochemistry* – 2012 – V. 86 – P. 87-91.
79. Masamrekh R.A., Kuzikov A.V., Haurychenka Y.I., Shcherbakov K.A., Veselovsky A.V., Filimonov D.A., Dmitriev A.V., Zavialova M.G., Gilep A.A., Shkel T.V., Strushkevich N.V., Usanov S.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. In vitro interactions of abiraterone, erythromycin, and CYP3A4: implications for drug–drug interactions // *Fundam Clin Pharmacol.* – 2020 – V. 34 – P. 120-130.
80. Масамрех Р.А. Кузиков А.В., Филиппова Т.А., Щербakov К.А., Веселовский А.В., Шумянцева В.В. Взаимодействие абиратерона и его фармакологически активного метаболита D4A с цитохромом P450 2C9 (CYP2C9) // *Биомедицинская химия*. - 2022. - Т. 68. -N 3. - С. 201-211.
81. Williams P.A., Cosme J., Sridhar V., Johnson E.F., Mc Ree D.E. The crystallographic structure of a mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity // *Mol Cell* – 2000 – V. 5 –P. 121—32.
82. Dmitriev V. A., Lagunin A. A., Karasev A. D., Rudik V. A., Pogodin V. P., Filimonov A. D., Poroikov V. V. Prediction of Drug-Drug Interactions Related to Inhibition or Induction of Drug-Metabolizing Enzymes // *Current Topics in Medicinal Chemistry* – 2019 – V.19 Iss. 5. – P. 319-336.
83. Hansten P.D., Horn J.R., Hazlet T.K. ORCA: OpeRational ClassificAtion of drug interactions // *J. Am. Pharm. Assoc.* – 2001 – V. 41 – P. 161–165.
84. Ponnusamy P. Molecular modeling and molecular docking studies on the derivatives of 1,4-dihydropyridine towards Cytochrome P450 for structure based drug design // *Materials Today: Proceedings*. – 2021 –V. 47 –P. 1798-1806.

85. Morant M., Bak S., Møller B. L., Werck-Reichhart D. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2003 - V. 14 – Iss. 2 – P. 151–162.
86. Memelink J., Verpoorte R., Kijne J.W. ORCANization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism // *Trends in Plant Science.* – 2001. – V. 6 – Iss. 5 - P. 212-219.
87. Jennewein S., Croteau R. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001 – V. 57 – P. 13–19.
88. Falck J.R., Reddy Y.K., Haines D.C., Reddy K.M., Krishna U.M., Graham S., Murry B., Peterson J.A. Practical, enantiospecific syntheses of 14,15-EET and leukotoxin B (vernolic acid) // *Tetrahedron Lett.* – 2001 – V. 42 – Iss.25 – P. 4131-4133
89. Krishnan S. Bioelectrodes for evaluating molecular therapeutic and toxicity properties // *Curr. Opin. Electrochem.* - 2020- V. 19 - P. 20–26.
90. Sakaki T. Practical application of cytochrome P450 // *Biol. Pharm. Bull.* – 2012 – V. 35 – Iss. 6 – P. 844–849.
91. Di Nardo, G., Gilardi, G. Natural Compounds as Pharmaceuticals: The Key Role of Cytochromes P450 Reactivity // *Trends Biochem. Sci.* – 2020 – V. 45 – Iss. 6 – P. 511-525.
92. Girhard, M., Bakkes, P.J., Mahmoud, O., Urlacher, V.B. P450 Biotechnology // *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry* /edited by Ortiz de Montellano P.R. – 4th edition. – Springer International Publishing Switzerland 2015. –V.1 – Ch. 8 - P. 451-520.
93. Urlacher V.B., Girhard M. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application // *Trends Biotechnol.* – 2012 – V. 30 – Iss. 1 – P. 26-36.
94. Bernhardt R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts // *J. Biotechnol.* – 2006 – V. 124 – Iss. 1 – P. 128-145.
95. Yun C.-H., Kim K.-H., Kim D.-H., Jung H.-C., Pan J.-G. The bacterial P450 BM3: a prototype for a biocatalyst with human P450 activities // *Trends Biotechnol* – 2007 – V. 25 –Iss. 7 –P. 289–298.
96. Correddu D., Di Nardo G., Gilardi G. Self-Sufficient Class VII Cytochromes P450: From Full-Length Structure to Synthetic Biology Applications // *Trends Biotechnol.* - 2021 V. 39 – Iss. 11 - 1184-1207.
97. Gilardi G., Meharena Y. T., Tsotsou G. E., Sadeghi S. J., Fairhead M., Giannini S. Molecular Lego: design of molecular assemblies of P450 enzymes for nanobiotechnology // *Biosens. Bioelectron.* – 2002 – V. 17 – Iss. 1-2 – P. 133–145.
98. Cirino P., Arnold F. Regioselectivity and Activity of Cytochrome P450 BM-3 and Mutant F87A in Reactions Driven by Hydrogen Peroxide // *Adv. Synth. Catal.* – 2002 – V. 344 – P. 932-937.

99. Strohmaier S.J., De Voss J.J., Jurva U., Andersson S., Gillam E.M.J. Oxygen Surrogate Systems for Supporting Human Drug-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes // *Drug Metab. Dispos.* – 2020 – V. 48 – Iss. 6 – P. 432-437.
100. Albertolle M.E., Guengerich F.P. The relationships between cytochromes P450 and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Production, reaction, and inhibition // *J. Inorg. Biochem.* – 2018 – V. 186 – P. 228–234.
101. Veith A., Moorthy B. Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species // *Curr. Opin. Toxicol.* – 2018 – V. 7 – P. 44–51.
102. Girhard M., Kunigk E., Tihovsky S., Shumyantseva V.V., Urlacher V.B. Light-driven biocatalysis with cytochrome P450 peroxygenases // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2013 – V. 60 – Iss. 1 – P. 111-118.
103. Chen H., Huang M., Yan W., Bai W.-J., Wang X. Enzymatic Regio- and Enantioselective C–H Oxyfunctionalization of Fatty Acids // *ACS Catal.* – 2021 – V. 11 – P. 10625–10630.
104. Wise C.E., Hsieh C.H., Poplin N.L., Makris T.M. Dioxygen Activation by the Biofuel-Generating Cytochrome P450 OleT // *ACS Catal.* - 2018 – V. 8 – Iss. 10 – P. 9342-9352.
105. Yamazaki H., Nakano M., Imai Y., Ueng Y.-F., Guengerich F. P., Shimada T. Roles of Cytochrome b5 in the Oxidation of Testosterone and Nifedipine by Recombinant Cytochrome P450 3A4 and by Human Liver Microsomes // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1996 – V. 325 – V. 2 – P. 174–182.
106. Backes W.L., Kelley R.W. Organization of multiple cytochrome P450s with NADPH-cytochrome P450 reductase in membranes // *Pharmacol. Ther.* – 2003 – V. 98 – Iss. 2 – P. 221–233.
107. Shangguan L., Wei Y., Liu X., Yu J., Liu S. Confining a bi-enzyme inside the nanochannels of a porous aluminum oxide membrane for accelerating the enzymatic reactions // *Chem. Commun.* – 2017 – V. 53 – P. 2673-2676.
108. Furlani I.L., Oliveira R.V., Cass Q.B. Immobilization of cytochrome P450 enzymes onto magnetic beads: An approach to drug metabolism and biocatalysis // *Talanta Open* - 2023 – V. 7 – 100181.
109. Brian W.R., Sari M.A., Iwasaki M., Shimada T., Kaminsky L.S., Guengerich F.P. Catalytic activities of human liver cytochrome P-450 IIIA4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochem.* - 1990 – V. 29 – Iss. 51 – P. 11280–11292.
110. Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data // *Drug Metab. Rev.* – 2002 – V. 34 – Iss. 1-2 – P. 83–448.
111. Srdi'c M., Fessner N.D., Yildiz D., Glieder A., Spiertz M., Schwaneberg U. Preparative Production of Functionalized (N- and O-Heterocyclic) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Human Cytochrome P450 3A4 in a Bioreactor // *Biomolecules* – 2022 – V. 12 - 153.

112. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Schmid R.D., Archakov A.I. Photochemical properties of a riboflavins/cytochrome P450 2B4 complex // *Biosens. Bioelectron.* – 2002 – V. 17 – Iss. 3 – P. 233-238.
113. Meyer L.-E., Eser B.E., Kara S. Coupling light with biocatalysis for sustainable synthesis – very recent developments and future perspectives // *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry.* – 2021 – V. 31. – P. 100496.
114. Le T.-K., Park J.H., Choi D.S., Lee G.-Y., Choi W.S., Jeong K.J., Park C.B., Yun C.-H. Solar-driven biocatalytic C-hydroxylation through direct transfer of photo induced electrons // *Green Chem.* – 2019 – V. 21 – P. 515-525.
115. Park J.H., Lee S.H., Cha G.S., Choi D.S., Nam D.H., Lee J.H., Lee J.-K., Yun C.-H., Jeong K.J., Park C.B. Cofactor-Free Light-Driven Whole-Cell Cytochrome P450 Catalysis // *Angew. Chem.* – 2015 – V. 54 – Iss. 3. – P. 969–973.
116. Varfolomeev S. D., Berezin I. V. Enzymes as catalysts of electrochemical reactions // *Journal of Molecular Catalysis.* – 1978 – V. 4 – Iss. 6 – P. 387–399.
117. Berezin I.V., Varfolomeev S.D., Bioelectrocatalysis as a new phenomenon // *Frontiers of Bioorganic Chemistry and Molecular Biology* / Edited by S.N. Ananchenko - Pergamon, 1980 - P. 467-473.
118. Archakov A.I., Kuznetsov B.V., Izotov M.V., Karuzina I.I. Cytochrome P450 inactivation on a cathode // *Biofizika* – 1981 – V. 26 – Iss. 2 – P. 352-354.
119. Shumyantseva V. V., Kuzikov A. V., Masamrekh R. A., Bulko T. V., Archakov A. I. From electrochemistry to enzyme kinetics of cytochrome P450 // *Biosens. Bioelectron.* – 2018 – V.15 – Iss. 121 – P. 192-204.
120. Ducharme J., Auclair K. Use of bioconjugation with cytochrome P450 enzymes // *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* – 2018 – V. 1866 – Iss. 1 - P. 32-51.
121. Valikhani D., Bolivar J. M., Pelletier J. N. An Overview of Cytochrome P450 Immobilization Strategies for Drug Metabolism Studies, Biosensing, and Biocatalytic Applications: Challenges and Opportunities // *ACS Catal.* – 2021 – V.11 – Iss. 15 – P. 9418–9434.
122. Bistolas N., Wollenberger U., Jung C., Scheller F.W. Cytochrome P450 biosensors — a review // *Biosens. Bioelectron.* – 2005 – V. 20 – Iss. 12 – P. 2408-2423
123. Asturias-Arribas L., Alonso-Lomillo M. A., Domínguez-Renedo O., Arcos-Martínez M. J. Electrochemical determination of cocaine using screen-printed cytochrome P450 2B4 based biosensors // *Talanta* – 2013 – V. 105 – P. 131-134.
124. Rusling F., Wang B., Yun S. Electrochemistry of redox enzymes // *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications* / edited by P.N. Bartlett - John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, 2008 – Ch. 2 - P. 39–85.

125. Miller W.L. Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer // *Endocrinology* – 2005 – V. 146 – Iss. 6 - 2544–2550.
126. Dodhia V.R., Sassone C., Fantuzzi A., Di Nardo G., Sadeghi S.J., Gilardi G. Modulating the coupling efficiency of human cytochrome P450 CYP3A4 at electrode surfaces through protein engineering // *Electrochemistry Communications*. – 2008 – V. 10 – Iss. 11 – P. 1744-1747.
127. Zhang C., Lu M., Lin L., Huang Z., Zhang R., Wu X., Chen Y. () Riboflavin is directly involved in N-dealkylation catalyzed by bacterial cytochrome P450 monooxygenases // *ChemBioChem* – 2020 – V. 21 – Iss. 16 – P. 2297–2305.
128. Gray J.J. The interaction of proteins with solid surfaces // *Curr. Opin. Structur. Biol.* – 2004 – V. 14 – P. 110-115.
129. Mie Y., Ikegami M., Komatsu Y. Nanoporous Structure of Gold Electrode Fabricated by Anodization and Its Efficacy for Direct Electrochemistry of Human Cytochrome P450 // *Chem. Lett.* – 2016 – V. 45 – P. 640–642.
130. Dai Q., Yang L., Wang Y., Cao X., Yao C., Xu X Surface charge-controlled electron transfer and catalytic behavior of immobilized cytochrome P450 BM3 inside dendritic mesoporous silica nanoparticles // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2020 – V. 412 –P. 4703–4712.
131. Udit A.K., Hindoyan N., Hill M.G., Arnold F.H., Gray H.B. Proteinsurfactant film voltammetry of wild-type and mutant cytochrome P450 BM3 // *Inorg Chem.* – 2005 – V. 44 – Iss. 12 – P. 4109–11.
132. Xu X., Zheng Q., Bai G., Dai Q., Cao X., Yao Y., Liu S., Yao C. Polydopamine functionalized nanoporous graphene foam as nanoreactor for efficient electrode-driven metabolism of steroid hormones // *Biosens. Bioelectron.* – 2018 – V. 119 – P. 182-190.
133. Lu J., Li H., Cui D., Zhang Y., Liu S. Enhanced enzymatic reactivity for electrochemically driven drug metabolism by confining cytochrome P450 enzyme in TiO<sub>2</sub> nanotube arrays // *Anal. Chem.* – 2014 – V. 86 – P. 8003–8009.
134. K uchler A., Yoshimoto M., Luginb uhl S., Mavelli F., Walde P. Enzymatic reactions in confined environments // *Nature Nanotech.* – 2016 – V. 11 – P. 409–420.
135. Krishnan S., Rusling J.F. Thin film voltammetry of metabolic enzymes in rat liver microsomes // *Electrochem. Comm.* – 2007 – V. 9 – Iss. 9 – P. 2359-2363.
136. Walgama C., Nerimetla R., Materer N.F., Schildkraut D., Elman J.F., Krishnan S. A Simple Construction of Electrochemical Liver Microsomal Bioreactor for Rapid Drug Metabolism and Inhibition // *Assays Anal. Chem.* – 2015 – V. 87 – Iss. 9 – P. 4712–4718.
137. Walker A., Walgama C., Nerimetla R., Alavi S.H., Echeverria E., Harimkar S.P., McIlroy D.N., Krishnan S. Roughened graphite biointerfaced with P450 liver microsomes: Surface and electrochemical characterizations // *Colloids Surf., B* - 2020 – V. 189 - 110790.

138. Nerimetla R., Krishnan S. Electrocatalysis by subcellular liver fractions bound to carbon nanostructures for stereoselective green drug metabolite synthesis // *Chem. Comm.* - 2015 – V. 51 – Iss. 58 – P. 11681–11684.
139. Xu X., Bai G., Song L., Zheng Q., Yao Y., Liu S., Yao C. Fast steroid hormone metabolism assays with electrochemical liver microsomal bioreactor based on polydopamine encapsulated gold-graphene nanocomposite // *Electrochim. Acta* – 2017 – V. 258 – Iss. 1365-1374.
140. Nerimetla R., Premaratne G., Liu H., Krishnan S. Improved electrocatalytic metabolite production and drug biosensing by human liver microsomes immobilized on amine-functionalized magnetic nanoparticles // *Electrochim. Acta* – 2018 – V. 280 – P. 101-107.
141. Kahma H., Filppula A.M., Launiainen T., Viinamäki J., Neuvonen M., Evangelista E.A., Totah R.A., Backman J.T. Disparities in CYP2C8 Inactivation between Enzyme Sources // *Drug Metab. Dispos.* – 2019 – V. 47 – Iss. 4 – P. 436-443.
142. Kumar V., Rock D.A., Warren C.J., Tracy T.S., Wahlstrom J.L. Enzyme Source Effects on CYP2C9 Kinetics and Inhibition // *Drug Metab. Dispos.* – 2006 – V. 34 – Iss. 11 – P. 1903-1908.
143. Sultana N., Schenkman J.B., Rusling J.F. Protein Film Electrochemistry of Microsomes Genetically Enriched in Human Cytochrome P450 Monooxygenases // *J. Am. Chem. Soc.* - 2005 – V. 127 – Iss. 39 – P. 13460–13461
144. Nerimetla R., Walgama C., Singh V., Hartson S.D., Krishnan S. Mechanistic Insights on the Voltage-driven Biocatalysis of a Cytochrome P450 Bactosomal Film on a Self-assembled Monolayer // *ACS Catal.* - 2017 – V. 7 – Iss. 5 – P. 3446–3453.
145. Kaluzhskiy L.A., Gnedenko O.V., Gilep A.A., Strushkevich N.V., Shkel T.V., Chernovetsky M.A., Ivanov A.S., Lisitsa A.V., Usanov A.S., Stonik V.A., Archakov A.I. Screening of human cytochrome P450(51) (CYP51A1) inhibitors: structural lanosterol analogues of plant and animal origin // *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* – 2014 – V. 8 – Iss. 4 – P. 349-360.
146. Davydov R., Strushkevich N., Smil D., Yantsevich A., Gilep A., Usanov S., Hoffman B.M. Evidence that compound I Is the active species in both the hydroxylase and lyase steps by which P450<sub>scc</sub> converts cholesterol to pregnenolone: EPR/ENDOR/cryoreduction/annealing studies // *Biochemistry* – 2015 – V. 54 – Iss. 48 – P. 7089-7097.
147. Yablokov E.O., Sushko T.A., Ershov P.V., Florinskaya A.V., Gnedenko O.V., Shkel T.V., Grabovec I.P., Strushkevich N.V., Kaluzhskiy L.A., Usanov S.A., Gilep A.A., Ivanov A.S. A large-scale comparative analysis of affinity, thermodynamics and functional characteristics of interactions of twelve cytochrome P450 isoforms and their redox partners // *Biochimie* – 2019 – V. 162 – P. 156-166.

148. Gilep A.A., Guryev O.L., Usanov S.A., Estabrook R.W. Apo-cytochrome b5 as an indicator of changes in heme accessibility: preliminary studies with cytochrome P450 3A4 // *J. Inorg. Biochem.* – 2001 – V. 87 – P. 237-244.
149. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction // *Biochem J.* – 1953 - V. 55 – Iss. 3. - P. 416–421.
150. Shumyantseva V. V., Bulko T. V., Kuzikov A. V., Masamrek R. A., Konyakhina A. Yu., Romanenko I., Max J. B., Köhler M., Gilep A. A., Usanov S. A., Pergushov D. V., Schacher F. H., Sigolaeva L. V. All-electrochemical nanocomposite two-electrode setup for quantification of drugs and study of their electrocatalytic conversion by cytochromes P450 // *Electrochimica Acta* – 2020 - V. 336 – 135579.
151. Kuzikov, A.V., Filippova, T.A., Masamrek, R.A., Shumyantseva, V.V. (2022) Electroanalysis of 4' Hydroxydiclofenac for CYP2C9 Enzymatic Assay. *Electrocatalysis*, 13(5), 630-640. DOI:10.1007/s12678-022-00753-3
152. 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 – P. 108277.
153. 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 – Iss. 3 – P. 241-248.
154. Masamrek R., Kuzikov A., Veselovsky A., Toropygin I., Shkel T., Strushkevich N., Gilep A., Usanov S., Archakov A., Shumyantseva V. Interaction of 17 $\alpha$ -hydroxylase, 17(20)-lyase (CYP17A1) inhibitors - abiraterone and galeterone - with human sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) // *Journal of Inorganic Biochemistry* –2018 – V.186 – P. 24-33.
155. Denisov I.G., Frank D.J., Sligar S.G. Cooperative properties of cytochromes P450 // *Pharmacology & Therapeutics* – 2009 – V.124 – Iss. 2 – P. 151-167.
156. Korzekwa K.R., Krishnamachary N., Shou M., Ogai A., Parise R.A., Rettie A.E, Gonzalez F.J., Tracey T.S. Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites // *Biochemistry* –1998 – V. 37. – P. 4137-4147.
157. Shou M., Dai R., Korzekwa K.R., Baillie T.A., Rushmore T.H. A kinetic model for the metabolic interaction of two substrates at the active site of cytochrome P450 3A4 // *Journal of Biological Chemistry* – 2001 –V. 276. – P. 2256-2262.
158. A.A. Archakov, G.I. Bachmanova, *Cytochrome P450 and Active Oxygen*, Taylor & Francis, London, 1990.

159. 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 Р450-зависимой системы *in vitro* // Биомедицинская химия – 2020 –Т. 66 – Вып. 3. – С. 241-249.
160. Zuccarello L., Barbosa C., Todorovic S., Selivera C.M. Electrocatalysis by Heme Enzymes-Applications in Biosensing // Catalysts – 2021 – V. 11 – Iss. 2 - 218.
161. Lamb D.C., Waterman M.R., Kelly S.L., Guengerich F.P. Cytochromes P450 and drug discovery // Curr. Opin. Biotechnol. – 2007 – V. 18 – Iss. 6 – P. 504-512.
162. Guengerich F. P. Drug Metabolism: Cytochrome P450 // Reference Module in Biomedical Sciences - Elsevier, Netherlands, 2021.
163. Bavishi K., Laursen T., Martinez K.L., Møller B.L., Della Pia E.A. Application of nanodisc technology for direct electrochemical investigation of plant cytochrome P450s and their NADPH P450 oxidoreductase // Sci. Rep. – 2016 – V. 6 - 29459.
164. Shumyantseva V.V., Uvarov V.Y., Byakova O.E., Archakov A.I., Semisynthetic flavocytochromes based on cytochrome P450 2B4: reductase and oxygenase activities // Arch. Biochem. Biophys – 1998 – V. 354 – Iss. 1 - 133–138.
165. Tan, S. L. J., Kan, J. M., & Webster, R. D. (2013). Differences in Proton-Coupled Electron-Transfer Reactions of Flavin Mononucleotide (FMN) and Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) between Buffered and Unbuffered Aqueous Solutions. The Journal of Physical Chemistry B, 117(44), 13755–13766. doi:10.1021/jp4069619
166. 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 – P. 383.
167. Valero-Calvo D., Escosura-Muñiz A. Electroanalytical systems based on solid-state nanochannel arrays for the detection of biomarkers of interest in clinical diagnostics // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2024 – V. 172 – P. 117568.
168. Tempel W., Grabovec I., MacKenzie F., Dichenko Y.V., Usanov S.A., Gilep A.A., Park H.-W., Strushkevich N. Structural characterization of human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase // J Lipid Res. - 2014. - V. 55 – Iss. 9 - P. 1925–1932.
169. Randles J.E.B. A cathode-ray polarograph. Part II – The current-voltage curves // Trans Faraday Soc. – 1948 - V. 44 - P. 327.
170. Chen H.C., Chang C.C., Yang K.H., Mai F.D., Tseng C.L., Chen L.Y., Hwang B.J., Liu Y.C. Polypyrrole electrode with a greater electroactive surface electrochemically polymerized in

plasmon-activated water // *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.* – 2018 - V. 82 - P. 252–260.

171. Johnson D.L., Lewis B.C., Elliot D.J., Miners J.O., Martin L.L. Electrochemical characterization of the human cytochrome P450 CYP2C9 // *Biochem. Pharmacol.* – 2005 - V. 69 – Iss. 10 – P. 1533–1541.

172. Lu J., Cui D., Li H., Zhang Y., Liu S. Cytochrome P450 bienzymes assembled on Au/chitosan/reduced graphene oxide nanosheets for electrochemically-driven drug cascade metabolism // *Electrochim. Acta.* – 2015 - V. 165 - P. 36–44.

173. 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.

174. Rusling, J.F. Enzyme Bioelectrochemistry in Cast Biomembrane-Like Films // *Acc. Chem. Res.* – 1998 – V. 31 – P. 363–369.

175. Palmer M.; Harris R.; Freytag C.; Kehoe M.; Trantum-Jensen J.; Bhakdi S. Assembly mechanism of the oligomeric streptolysin O pore: The early membrane lesion is lined by a free edge of the lipid membrane and is extended gradually during oligomerization // *EMBO J.* – 1998 – V. 17 – P. 1598–1605.

176. Wilkop T.; Xu D.; Cheng Q. Electrochemical Characterization of Pore Formation by Bacterial Protein Toxins on Hybrid Supported Membranes // *Langmuir* – 2008 – V. 24 – P. 5615–5621.

177. Teng K.W.; Ishitsuka Y.; Ren P.; Youn Y.; Deng X.; Ge P.; Lee S.H.; Belmont A.S.; Selvin P.R. Labeling proteins inside living cells using external fluorophores for microscopy // *eLife* – 2016 – V. 5 - e20378.

178. Li X.-F., Zhang G.-Y., Dong J.-F., Zhou X.-H., Hong X.-L. An Atomic Force Microscopy Study on Small Unilamellar Vesicle Structures on Mica // *Chin. J. Chem.* – 2006 – V. 24 – P. 311–315.

179. Boussaad S., Tao N.J. Electron Transfer and Adsorption of Myoglobin on Self-Assembled Surfactant Films: An Electrochemical Tapping-Mode AFM Study // *J. Am. Chem. Soc.* – 1999 – V. 121 – P. 4510–4515.

180. Riley R.J.; Howbrook D. In Vitro analysis of the activity of the major human hepatic CYP enzyme (CYP3A4) using [N-methyl-14C]-erythromycin // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* – 1997 – V. 38 – P. 189–193.

181. 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. – Iss. 4. – P. 457.*
182. Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Filippova T.A., Tumilovich A.M., Strushkevich N.V., Gilep A.A., Khudoklinova Y.Yu., Shumyantseva V.V. Bielectrode Strategy for Determination of CYP2E1 Catalytic Activity: Electrodes with Bactosomes and Voltammetric Determination of 6-Hydroxychlorzoxazone // *Biomedicines – 2024 – V. 12 – Iss. 1 - 152.*
183. Shen S., Marchick M.R., Davis M.R., Doss G.A., Pohl L.R. Metabolic activation of diclofenac by human cytochrome P450 3A4: role of 5-hydroxydiclofenac // *Chem Res Toxicol. – 1999 – V. 12 – P. 214–222.*
184. Tang C., Fang Y., Booth-Genthe C., Kuo Y., Kuduk S.D., Rushmore T.H., Carr B.A. Diclofenac hydroxylation in monkeys: Efficiency, regioselectivity, and response to inhibitors // *Biochemical pharmacology. – 2007 – V. 73 – P. 880 – 890.*
185. Ngui J.S., Tang W., Stearns R.A., Shou M., Miller R.R., Zhang Y., Lin J.H., Baillie T.A., Cytochrome P450 3A4-mediated interaction of DF and quinidine // *Drug Metab Dispos. – 2000 – V. 28 – Iss. 9 – P. 1043-1050.*
186. 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,*
187. Baj-Rossi C., Müller C., von Mandach U., De Micheli G., Carrara S. Faradic peaks enhanced by carbon nanotubes in microsomal cytochrome P450 electrodes // *Electroanalysis – 2015 – V. 27 – P. 1507-1515.*

## Приложение 1

Электрохимический отклик ФМН иммобилизованного на поверхности ПГЭ  
модифицированного ДДАБ

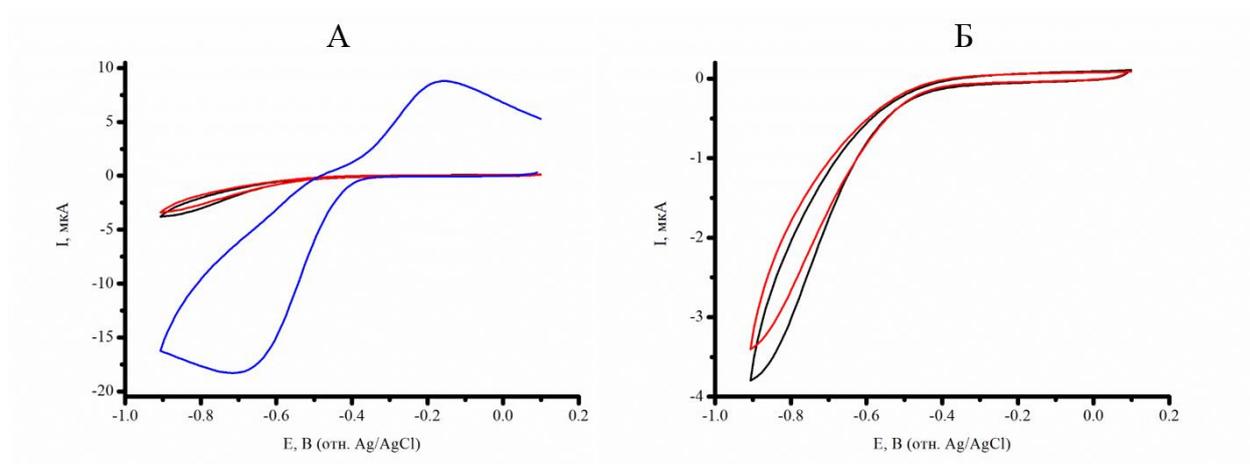


Рисунок 1. (А) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/210 мкМ ФМН (красная линия), ПГЭ/ДДАБ/ 2 мМ ФМН (синяя линия). (Б) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ (черная линия), ПГЭ/ДДАБ/210 мкМ ФМН (красная линия). Измерения проводились в горизонтальном режиме, в 60 мкл 0,1 М калий-фосфатного буфера, рН 7,4, содержащего 0,05 М NaCl. Диапазон потенциалов +0,1 ÷ -0,9 В, скорость сканирования 0,1 В/с.

Потенциал восстановления 2 мМ ФМН  $E_{\text{red}} = -0,655$  В, ток восстановления 2 мМ ФМН  $I_{\text{red}} = -9,04$  мкА.

Потенциал окисления 2 мМ ФМН  $E_{\text{ox}} = -0,172$  В, ток окисления 2 мМ ФМН  $I_{\text{ox}} = 5,84$  мкА.

## Приложение 2

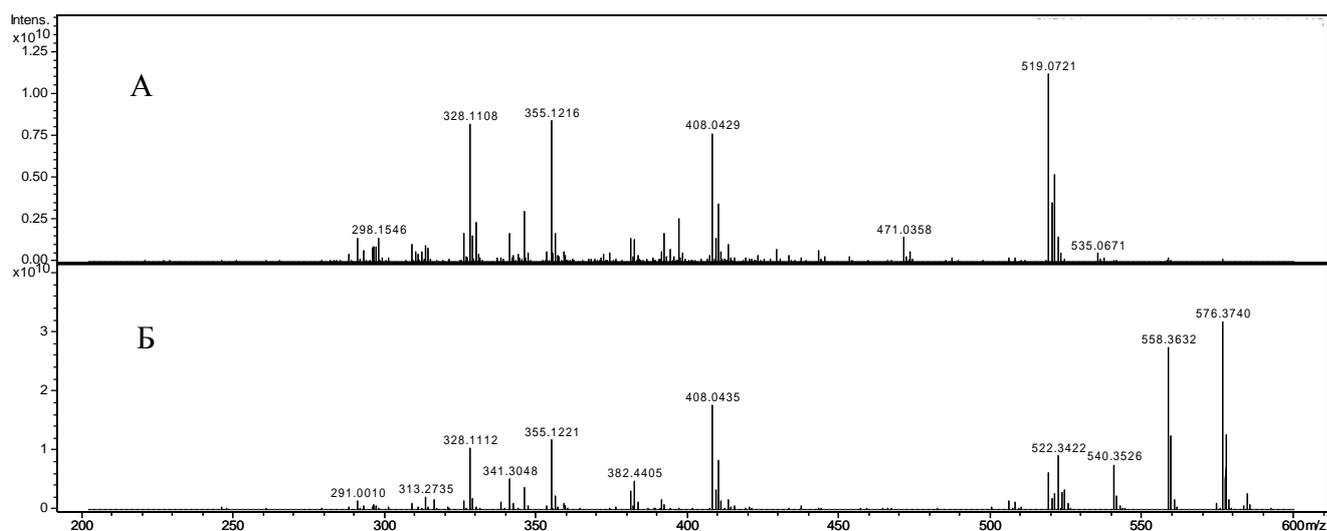


Рисунок 1. Масс-спектры, полученные после электрокаталитической реакции СУР3А4-зависимого превращения омепразола (А), а также при протекании электрокаталитической реакции СУР3А4-зависимого превращения омепразола в присутствии эритромицина (Б).

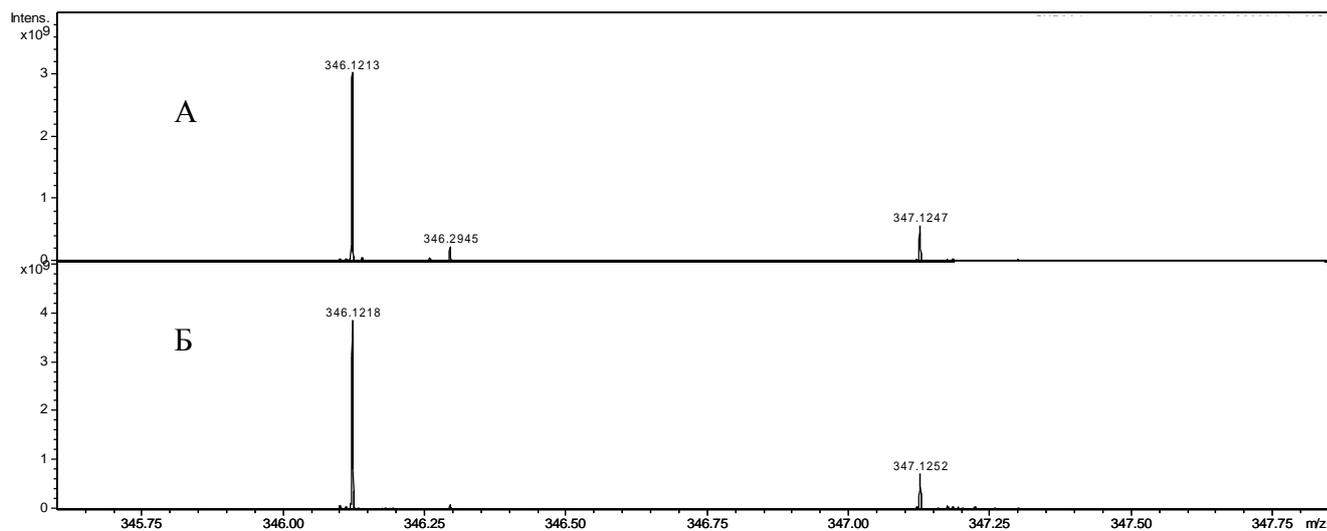


Рисунок 2. Масс-спектры, содержащие пик омепразола (расчетное значение  $m/z$  346,4245) полученной после электрокаталитической реакции СУР3А4-зависимого превращения омепразола (А), а также при протекании электрокаталитической реакции СУР3А4-зависимого превращения омепразола в присутствии эритромицина (Б).

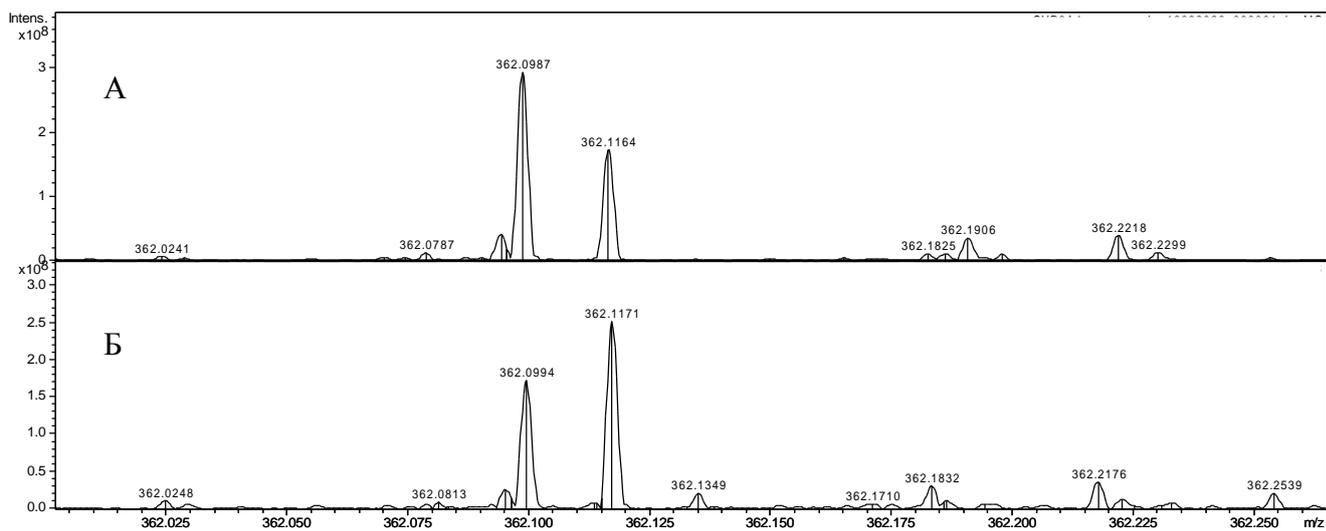


Рисунок 3. Масс-спектры, содержащие пик омепразол сульфона (расчетное значение  $m/z$  362,1162) полученной после электрокаталитической реакции СУРЗА4-зависимого превращения омепразола (А), а также при протекании электрокаталитической реакции СУРЗА4-зависимого превращения омепразола в присутствии эритромицина (Б).