

На правах рукописи

Кузиков Алексей Владимирович

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ
ЦИТОХРОМА P450: ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ И
КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ**

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2025

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

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Шумянцева Виктория Васильевна

Официальные оппоненты: **Гришанова Алевтина Юрьевна**
доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук, руководитель лаборатории биохимии чужеродных соединений

Вакулин Иван Валентинович
доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский университет науки и технологий», профессор кафедры органической и биоорганической химии Института химии и защиты в чрезвычайных ситуациях

Сычев Дмитрий Алексеевич
доктор медицинских наук, профессор, профессор РАН, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования" Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой клинической фармакологии и терапии имени академика Б.Е. Вотчала

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Защита состоится «15» мая 2025 года в 13 часов на заседании диссертационного совета 24.1.172.01 (Д 001.010.01) в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

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

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности. Определение кинетических параметров цитохром Р450-зависимых реакций имеет принципиальное значение при исследовании метаболизма лекарственных соединений, выявлении ингибиторов и оценке межлекарственных взаимодействий. Электрохимические методы занимают одно из ведущих мест в изучении энзимологии гем-тиолатных ферментов суперсемейства цитохрома Р450. С помощью электрохимических методов могут быть определены окислительно-восстановительные потенциалы и кинетические параметры этих ферментов [Gilardi, 2018]. Преимуществом электрохимических систем для исследования каталитических свойств цитохромов Р450 является отсутствие необходимости использования восстанавливающих коферментов и редокс-партнерных белков, поскольку каталитические реакции в присутствии субстратов инициируются путем восстановления иона железа гема фермента электронами с электрода [Sadeghi и соавт., 2011; Li и соавт., 2020; Krishnan, 2020; Kumar и соавт., 2023]. В присутствии органических субстратов и кислорода наблюдается увеличение амплитуды восстановительного тока иона железа гема цитохромов Р450 (каталитический ток), связанное с протеканием каталитической реакции в электрохимической системе [Schneider, Clark, 2013]. Регистрируя с помощью электрохимических методов изменение амплитуды восстановительного тока цитохромов Р450 при титровании субстратами, можно определять значения константы Михаэлиса (K_M) и константы каталитической (k_{cat}) [Gilardi, 2018], а также охарактеризовать специфичность фермента и исследовать влияние ингибиторов. Несмотря на практическое удобство регистрации активности цитохромов Р450 по каталитическому току, вследствие неполного сопряжения каталитического цикла этих ферментов для точного определения кинетических параметров, в особенности k_{cat} , необходимы идентификация и количественное определение образующихся метаболитов [Sadeghi и соавт., 2011; Panicco и соавт., 2018; Mie и соавт., 2018]. Для этих целей при использовании электрохимических систем для определения активности цитохромов Р450 необходимо дополнительно применять трудоемкие хроматографические и масс-спектрометрические методы [Schneider, Clark, 2013; de Rond и соавт., 2019], что ограничивает проведение высокопроизводительных исследований функциональной активности цитохромов Р450 в экспериментальной фармакологии [Lim и соавт., 2010]. Таким образом, актуальной является разработка новых высокопроизводительных и удобных в практическом применении электрохимических систем для идентификации и количественного определения метаболитов, образующихся при протекании цитохром Р450-зависимых каталитических реакций.

Решение проблемы, связанной с точным определением параметров стационарной кинетики цитохромов Р450, может быть достигнуто в случае использования биелектродной системы, в которой один из электродов служит для иммобилизации цитохромов Р450 и одновременно является донором электронов для восстановления иона железа гема фермента, а второй электрод – для

идентификации и количественного определения образующихся метаболитов путем их электрохимического окисления при потенциалах, отличных от потенциалов окисления субстратов. Достоинствами такой системы, помимо отсутствия необходимости реконструирования ферментативной системы, являются возможность избежать многоэтапных процессов разделения компонентов инкубационной смеси при количественном определении продуктов ферментативных реакций, а также высокая чувствительность электрохимического анализа. Использование взаимозаменяемых электродов, производимых методом трафаретной печати (печатных электродов), как для иммобилизации ферментов, так и для определения образующихся метаболитов позволяет миниатюризировать систему для определения активности цитохромов P450. Кроме того, проблема точного определения параметров стационарной кинетики иммобилизованных на электроде цитохромов P450 может быть решена путем разработки альтернативного подхода, в котором образующиеся метаболиты определяются спектрально по интенсивности в максимуме поглощения или флуоресценции при длине волны, отличной от таковой для субстрата. С помощью данной системы могут быть определены продукты ферментативных реакций, процесс электрохимического окисления которых на электроде затруднен, а также реакций, субстраты и продукты которых имеют близкие или одинаковые потенциалы окисления.

Предложенные подходы перспективны для практического использования при решении широкого спектра фундаментальных и прикладных задач энзимологии цитохромов P450, экспериментальной фармакологии при выявлении ингибиторов цитохромов P450 и прогнозе межлекарственных взаимодействий.

Учитывая вышесказанное, **целью** диссертационной работы являлась разработка электрохимических систем для идентификации метаболитов и кинетического анализа цитохром P450-зависимых реакций.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести исследование электрохимических свойств ряда субстратов и продуктов их цитохром P450-зависимых реакций ароматического гидроксирования, деалкилирования или ароматизации и оценить возможность их электрохимического определения.
2. Разработать биэлектродную электрохимическую систему, в которой один из электродов служит для иммобилизации рекомбинантных или мембраносвязанных цитохромов P450 и их электрохимического восстановления, а другой электрод – для идентификации и количественного определения образующихся метаболитов за счет их прямого электрохимического окисления.
3. С помощью разработанной биэлектродной системы исследовать кинетику реакций, катализируемых иммобилизованными на электроде изоферментами цитохрома P450 по отношению к их субстратам.

4. Разработать систему для определения электрокаталитической активности СYP3A4, иммобилизованного на электроде, по отношению к гидрокортизону, основанную на регистрации продукта реакции – 6 β -гидроксикортизола – методом флуоресцентной спектроскопии.
5. Оценить возможность применения разработанных систем для исследования ингибиторов цитохромов P450.

Личный вклад соискателя. Непосредственно соискателем выполнен анализ литературы и современного состояния по теме диссертационной работы, поставлена цель и сформулированы задачи исследования. Соискателем непосредственно разработаны новые оригинальные подходы к идентификации и количественному определению метаболитов ряда цитохром P450-зависимых реакций, основанные на применении электрохимических и флуоресцентных методов. Автором диссертационной работы показана возможность применения разработанных подходов для исследования кинетики цитохромов P450 19A1 (CYP19A1), 2C9 (CYP2C9), 2C19 (CYP2C19), 2E1 (CYP2E1) и 3A4 (CYP3A4). Все представленные в диссертационной работе эксперименты были спланированы соискателем лично. Эксперименты, математическая и статистическая обработка полученных результатов выполнялись автором лично либо при его непосредственном участии. По результатам диссертационной работы соискателем в соавторстве подготовлена 21 научная статья. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, были доложены на научных мероприятиях лично соискателем либо участниками проектов, в рамках которых осуществлялась финансовая поддержка исследования.

Научная новизна исследования. В диссертационной работе впервые разработана методология электрохимической идентификации и количественного определения продуктов электрокаталитических цитохром P450-зависимых реакций. Исследованы электрохимические свойства ряда метаболитов лекарственных или эндогенных соединений, образующихся при участии клинически значимых цитохромов P450 19A1, 2C9, 2C19, 2E1. Показано, что проанализированные соединения и их метаболиты, образующиеся в реакциях ароматического гидроксирования, деалкилирования или ароматизации, различаются по потенциалам электрохимического окисления. Основываясь на различиях электрохимических свойств субстратов CYP19A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 и их метаболитов, была разработана оригинальная электрохимическая система для определения активности цитохромов P450, в которой один из электродов служит для иммобилизации рекомбинантных или мембраносвязанных цитохромов P450 и донором электронов для восстановления иона железа гема, а второй – для идентификации и количественного определения образующихся продуктов путем их электрохимического окисления. Достоинством такой системы является отсутствие необходимости реконструирования ферментативной системы с использованием восстанавливающих коферментов и многоэтапных процессов разделения компонентов инкубационной смеси при определении активности цитохромов P450. Также был разработан

оригинальный подход для определения активности СYP3A4 по отношению к маркерному субстрату гидрокортизону, при котором фермент иммобилизован на электроде, а образующийся метаболит, 6 β -гидроксикортизол, определяется методом флуоресцентной спектроскопии после химической дериватизации.

Разработанные подходы могут использоваться в фармакологических исследованиях при выявлении и изучении свойств ингибиторов цитохромов P450 для поиска новых лекарственных соединений и оценки межлекарственных взаимодействий.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретической значимостью диссертационной работы является установление различий в электрохимических свойствах (таких как способность окисляться при различных потенциалах) ряда субстратов цитохромов P450 и их метаболитов, содержащих гидроксифенильные группы, образующихся в результате реакций ароматического гидроксирования, деалкилирования или ароматизации, что позволило разработать принципиально новую электрохимическую систему для определения каталитической активности цитохромов P450, иммобилизованных на электроде. Впервые обнаружены различия в спектрах флуоресценции гидрокортизона и продукта его биотрансформации – 6 β -гидроксикортизола, образующегося под действием СYP3A4, обработанных серной кислотой. На основании этого был разработан подход к определению активности СYP3A4, иммобилизованного на электроде, путем количественного флуоресцентного определения продукта ферментативной реакции. Практическая значимость работы состоит в том, что предложенные в работе подходы могут применяться при решении прикладных задач энзимологии цитохромов P450, моделировании ферментативных процессов в фармакологических исследованиях для *in vitro* оценки фармакокинетических параметров биотрансформации лекарственных соединений, выявления и изучения свойств ингибиторов, для поиска новых лекарственных соединений и прогноза межлекарственных взаимодействий. Также разработанные подходы могут использоваться для контроля каталитической активности цитохромов P450 при разработке новых стратегий их иммобилизации на электродах.

Методология и методы исследования. Работа основывается на фундаментальных знаниях о структурно-функциональной организации цитохром P450-содержащих систем, использовании методологии и методов электрохимического анализа для определения активности изоферментов цитохрома P450.

Положения, выносимые на защиту

1. Продукты цитохром P450-зависимых реакций ароматического гидроксирования, деалкилирования и ароматизации, приводящих к образованию гидроксифенильных производных, могут быть определены за счет их прямого электрохимического окисления при потенциалах, отличных от потенциалов окисления соответствующих субстратов.

2. Определение электрокаталитической активности цитохромов P450 и исследование ингибиторов может проводиться с помощью биелектродной системы, в которой один из электродов служит для иммобилизации и электрохимического восстановления рекомбинантных или мембраносвязанных ферментов, а другой электрод – для идентификации и количественного определения образующихся продуктов соответствующих ферментативных реакций.
3. Установлен механизм переноса электронов между электродом и компонентами бактосом и показана стимулирующая роль цитохром P450 редуктазы на электрокаталитическую активность CYP2E1 в составе бактосом.
4. Определение электрокаталитической активности CYP3A4 по отношению к гидрокортизону и исследование ингибиторов этого фермента может проводиться путем количественного флуоресцентного определения продукта ферментативной реакции – 6 β -гидрокортизола.

Степень достоверности и апробация работы. Диссертационная работа выполнена на высоком теоретическом, методическом и экспериментальном уровнях. Электрохимические исследования выполнялись на современных потенциостатах/гальваностатах Metrohm Autolab, Metrohm DropSens и PalmSens, абсорбционная спектроскопия выполнялась на двухлучевых спектрофотометрах Agilent Technologies и Shimadzu, флуоресцентная спектроскопия выполнялась с помощью спектрофлуориметра Agilent Technologies. Все приборы были снабжены специализированным программным обеспечением. Полученные результаты воспроизводимы и были обработаны общепринятыми методами статистического анализа с применением компьютерных программ. Выводы обоснованы и полностью вытекают из полученных экспериментальных результатов. Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на V Юбилейной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (МОБИ-ХимФарма2019) (Россия, Крым, Судак, 2019), на 24-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Россия, Пушино, 2020), на X Юбилейной Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2020» (Россия, Казань, 2020), на VII Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (МОБИ-ХимФарма2021) (Россия, Москва, 2021), на IV Съезде аналитиков России (Россия, Москва, 2022), на VII Съезде биохимиков, молекулярных биологов и физиологов России (Россия, Сочи, 2022), на XXIV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» (Россия, Томск, 2023).

Публикации по теме диссертации. По результатам диссертационной работы опубликовано 29 работ, в том числе 21 статья в рецензируемых научных изданиях и 8 работ в сборниках трудов научных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 274 страницах машинописного текста, включает 84 рисунка и 8 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), материалов и методов (Глава 2), результатов и их обсуждения (Глава 3), заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 377 источников, и приложения.

Диссертационная работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 18-315-00043 мол_а и 19-315-70003 мол_а_мос), Российского научного фонда (гранты № 17-75-20250 и 21-75-00048), Государственного задания на выполнения поисковых научных исследований, Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг, Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы) и Проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой дизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-305).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассматриваются значимость цитохромов P450 в живых системах, особенности структурно-функциональной организации основных цитохром P450-содержащих систем, широко использующиеся методы определения каталитической активности цитохромов P450. Проанализированы и систематизированы электрохимические подходы для определения активности цитохромов P450, описаны механизмы и кинетические закономерности протекания цитохром P450-зависимых реакций в электрохимических системах. Рассмотрена методология, основанная на использовании электрохимических методов, для идентификации и количественного определения продуктов ферментативных реакций, являющаяся составляющей биэлектродных систем для определения активности цитохромов P450.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Стандарты субстратов, продуктов и ингибиторов цитохром P450-зависимых реакций. Андростендион (99,6%), (*S*)-варфарин ($\geq 97\%$), гидрокортизон ($\geq 98\%$), диклофенак натриевая соль ($\geq 98\%$), кетоконазол ($\geq 99\%$), (*S*)-напроксен ($\geq 98\%$), (*S*)-О-десметилнапроксен ($\geq 98\%$), сульфафеназол ($\geq 98\%$), фенитоин ($\geq 99\%$), хлорзоксазон ($\geq 98\%$), экземестан ($> 98\%$), эстрон ($> 99\%$), β -эстрадиол (98%), 4'-гидроксидиклофенак ($\geq 98,5\%$), 4-гидроксифенитоин (98%), 6-гидрокси-хлорзоксазон ($\geq 98\%$), 6 β -гидрокси-кортизол ($\geq 98\%$), (*S*)-7-гидрокси-варфарин ($\geq 97\%$) были получены от Sigma-Aldrich, США. Тестостерон (99%) был получен от Acros Organics, США.

Флуконазол был выделен из препарата «Флуконазол Тева» (Teva Pharmaceutical Works, Венгрия) путем флэш хроматографии с последующей тонкослойной хроматографией.

Препараты ферментов. В работе использовались рекомбинантные СУР19А1 человека (45 мкМ в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 20% (по объему) глицерин, 300 мМ NaCl и 0,2% (по объему) CHAPS), полученный как описано ранее [Pechurskaya и соавт., 2007], СУР2С9 человека (255 мкМ или 263 мкМ в 600 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 20% (по объему) глицерин, 5 мМ β-меркаптоэтанол и 0,3% (по объему) CHAPS), полученный как описано ранее [Haidukevich и соавт., 2018], СУР2Е1 человека (72 мкМ в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 20% (по объему) глицерин, 400 мМ NaCl и 1 мМ ЭДТА), полученный как описано ранее [Svirid и соавт., 2017], СУР3А4 человека (131 мкМ в 550 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,2), содержащем 20% (по объему) глицерин, 1 мМ дитиотреитол и 0,2% (по объему) CHAPS), полученный как описано ранее [Giler и соавт., 2001], СУР2С19 человека (143,5 мкМ в 600 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 20% (по объему) глицерин и 0,3% (по объему) CHAPS), полученный как описано ранее [Ershov и соавт., 2019], микросомальный цитохром *b₅* (сyt *b₅*) человека (158 мкМ в 400 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 20% (по объему) глицерин и 0,2% (по объему) холат натрия), полученный как описано ранее [Holmans и соавт., 1994], цитохром Р450 редуктаза (CPR) крысы (165,9 мкМ в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,5), содержащем 20% (по объему) глицерин, 0,5 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотреитол), полученная как описано ранее [Bonina и соавт., 2005]. Все белки были получены в Институте биоорганической химии НАН Беларуси и предоставлены для исследования. Чистота всех используемых в работе ферментов составляла не менее 95% по данным электрофореза в полиакриламидном геле. Бактосомы с концентрацией белка 17,5 мг/мл, содержащие 4,3 мкМ СУР2Е1, CPR, коэкспрессированные в *Escherichia coli* и обогащенные 21,4 мкМ сyt *b₅* человека, были получены от Сурех, Великобритания. Каталаза (2000-5000 Ед/мг белка) была получена от Sigma-Aldrich, США.

Электроды. В работе использовались трехконтактные печатные электроды с графитовыми рабочим (диаметр 2 мм) и вспомогательными электродами и хлоридсеребряным (Ag/AgCl) электродом сравнения, полученные от «КолорЭлектроникс», Россия, с графитовыми рабочим (диаметр 4 мм) и вспомогательными электродами и серебряным (Ag) электродом сравнения, полученные от Metrohm DropSens, Испания, с графитовыми рабочим (диаметр 4 мм) и вспомогательными электродами и Ag/AgCl электродом сравнения, полученные от Poten, Китай.

Оборудование. Электрохимические измерения проводились с помощью потенциостатов/гальваностатов Autolab PGSTAT 12 Autolab и μAutolab Type III (Metrohm Autolab, Нидерланды), снабженных программным обеспечением GPES (версия 4.9.7), потенциостата/гальваностата μStat 400 (Metrohm DropSens, Швейцария), снабженного программным обеспечением DropView 8400, потенциостата EmStat3+ (PalmSens, Нидерланды), снабженного

программным обеспечением PStTrace (версия 5.8). Спектры флуоресценции регистрировались с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, США), снабженного программным обеспечением Cary Eclipse (версия 1.1(133)). Спектры поглощения регистрировались с помощью спектрофотометров Cary 100 Scan UV-Vis (Agilent Technologies, США), снабженного программным обеспечением Cary WinUV или UV-1900 (Shimadzu, Япония) с программным обеспечением UVProbe (версия 2.70).

Химическая модификация электродов и иммобилизация цитохромов P450, *cyt b₅*, CPR или бактосом. Печатные графитовые электроды (ПГЭ) были модифицированы 1 мкл (в случае использования электродов «КолорЭлектроникс»), 2 мкл (в случае использования электродов Metrohm DropSens) или 3 мкл (в случае использования электродов Poten) 100 мМ дидодецилдиметиламмония бромид (ДДАБ, 98%, Sigma-Aldrich, США) в хлороформе (99%, Acros Organics, США). На модифицированную поверхность рабочих электродов «КолорЭлектроникс» наносили по 1 мкл 255 мкМ или 263 мкМ CYP2C9 или 131 мкМ CYP3A4 или 45 мкМ CYP19A1 или на модифицированную поверхность электродов Metrohm DropSens по 2 мкл 255 мкМ или 263 мкМ CYP2C9 или по 1 мкл 143,5 мкМ CYP2C19 или на модифицированную поверхность электродов Poten по 0,5 мкл 50 мкМ CYP2E1 или 1,5 мкл 158 мкМ *cyt b₅* или 1,5 мкл 165,9 мкМ CPR или 1,5 мкл смеси, приготовленной из 0,46 мкл 72 мкМ CYP2E1 и 1,04 мкл 158 мкМ *cyt b₅*, или 1,5 мкл бактосом. ПГЭ с иммобилизованными белками или бактосомами оставляли на 10 мин при комнатной температуре и далее помещали в холодильник на +4°C до использования (не позднее следующего дня).

Исследование электрохимических свойств цитохромов P450, *cyt b₅*, CPR и бактосом в анаэробных условиях. Электрохимические параметры иммобилизованных на электродах белков или бактосом определяли методом циклической вольтамперометрии в анаэробных условиях в 1 мл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, насыщенного аргоном.

Количество электроактивного белка на поверхности электрода рассчитывалось по уравнению 1:

$$\text{Количество электроактивного белка (моль)} = \frac{Q}{nF}, \quad (1)$$

где Q – заряд, Кл, который может быть вычислен из циклических вольтамперограмм путем интегрирования пика, n – число электронов, участвующих в электрохимической реакции, F – постоянная Фарадея (96485 Кл/моль).

Для исследования электрохимических свойств бактосом и CPR в анаэробных условиях также использовался метод дифференциально-импульсной вольтамперометрии.

Исследование электрохимических свойств субстратов и продуктов цитохром P450-зависимых реакций. Электрохимические свойства андростендиона, тестостерона, эстрогена, β -эстрадиола, (*S*)-варфарина, (*S*)-7-гидроксиварфарина, диклофенака, 4'-гидроксидиклофенака, хлорзоксазона и 6-гидроксихлорзоксазона исследовались методом циклической вольтамперометрии

с помощью немодифицированных ПГЭ «КолорЭлектроникс». Электрохимические свойства (*S*)-напроксена, (*S*)-*O*-десметилнапроксена, фенитоина и 4-гидроксифенитоина исследовались с помощью немодифицированных ПГЭ Metrohm DropSens.

Электрохимическое определение продуктов цитохром Р450-зависимых реакций. Количественное определение продуктов цитохром Р450-зависимых реакций проводилось методом квадратно-волновой вольтамперометрии. Вольтамперограммы регистрировали при частоте 25 Гц, амплитуде 40 мВ и шаге потенциала 5 мВ. Для определения эстрогена, β-эстрадиола, (*S*)-7-гидроксиварфарина, 6-гидроксицлорзоксазона использовались немодифицированные ПГЭ «КолорЭлектроникс», а для определения 4'-гидроксициклофенака – модифицированные 1 мкл разведенной в 10 раз дистиллированной водой стабилизированной карбоксиметилцеллюлозой дисперсии 0,2% одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ) с диаметром $1,6 \pm 0,4$ нм, длиной > 5 мкм, площадью поверхности 1000 м²/г, полученной от OCSIAL. Для определения (*S*)-*O*-десметилнапроксена и 4-гидроксифенитоина использовались немодифицированные ПГЭ Metrohm DropSens. Для построения калибровочных зависимостей аналитических пиков окисления аналитов от их концентраций 60 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl и эстроген, β-эстрадиол, (*S*)-7-гидроксиварфарин, 4'-гидроксициклофенак, (*S*)-*O*-десметилнапроксен, 4-гидроксифенитоин или 6-гидроксицлорзоксазон в соответствующих концентрациях, наносили на поверхность ПГЭ в горизонтальном режиме, после чего регистрировались квадратно-волновые вольтамперограммы. Во всех случаях, кроме определения 6-гидроксицлорзоксазона, буфер также содержал 1% метанол (по объему).

Определение гидрокортизона и 6β-гидроксикортизола методом флуоресцентной спектроскопии. Флуоресцентные свойства гидрокортизона и 6β-гидроксикортизола исследовались методом флуоресцентной спектроскопии. Для дериватизации гидрокортизона и 6β-гидроксикортизола к 300 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и исследуемое соединение или смесь соединений (гидрокортизон и 6β-гидроксикортизол) в соответствующих концентрациях, добавляли 600 мкл смеси серной кислоты (95-98%, Fisher Scientific, Англия) и этанола (3:1 по объему). Полученный раствор инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и далее регистрировали спектр флуоресценции в диапазоне длин волн 400-600 нм в кварцевой кювете при длине волны возбуждения (λ_{ex}) 365 нм. Для построения калибровочной зависимости интенсивности пика эмиссии при длине волны (λ_{em}) 427 ± 2 нм от концентрации 6β-гидроксикортизола к 300 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 6β-гидроксикортизол (0-10 мкМ), добавляли 600 мкл смеси серной кислоты и этанола (3:1 по объему).

Определение электрокаталитической активности СУР19А1. ПГЭ с иммобилизованным СУР19А1 помещались в ячейку объемом 300 мкл, заполненную 100 мМ калий-фосфатным буфером

(pH 7,4), содержащим 50 mM NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации андростендиона или тестостерона. CYP19A1-зависимые реакции проводились при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки и при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,6 В (отн. Ag/AgCl) в течение 10-60 мин. После проведения электрокаталитических реакций 60 мкл реакционной смеси отбирались и наносились на поверхность немодифицированного ПГЭ с последующей регистрацией квадратно-волновых вольтамперограмм. Концентрации образующихся эстрогена или β -эстрадиола определяли по уравнению калибровочной зависимости амплитуды тока окисления этих соединений от их концентрации в стандартных растворах. Для исследования механизм-активируемого ингибирования CYP19A1 экзестаном ферментные электроды были проинкубированы в 60 мкл прогретого до 37°C в течение 5 мин 100 mM калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 mM NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации экзестана. После инкубации проводились CYP19A1-зависимые электрокаталитические реакции по отношению к экзестану при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,6 В (отн. Ag/AgCl) в течение 2,5-10 мин. После проведения электрокаталитических реакций смесь удалялась с поверхности электродов, и далее электроды помещались в ячейку объемом 300 мкл, заполненную 100 mM калий-фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 50 mM NaCl, 1% (по объему) метанол и 10 мкМ андростендион. Далее CYP19A1-зависимые электрокаталитические реакции по отношению к андростендиону и определение концентрации образующегося эстрогена проводили как описано выше.

Определение электрокаталитической активности CYP2C9 по отношению к (S)-варфарину. ПГЭ с иммобилизованным CYP2C9 помещались в ячейку, заполненную 1 мл 100 mM калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 mM NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации (S)-варфарина. CYP2C9-зависимые реакции проводились при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки и при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,6 В (отн. Ag/AgCl) в течение 30-60 мин. После проведения электрокаталитических реакций 60 мкл реакционной смеси отбирались и наносились на поверхность немодифицированного ПГЭ с последующей регистрацией квадратно-волновых вольтамперограмм. Концентрации образующегося (S)-гидроксиварфарина определяли по уравнению калибровочной зависимости амплитуды тока окисления этого соединения от его концентрации в стандартных растворах.

Определение электрокаталитической активности CYP2C9 по отношению к диклофенаку. ПГЭ с иммобилизованным CYP2C9 помещались в ячейку, заполненную 300 мкл 100 mM калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 mM NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации диклофенака. CYP2C9-зависимые реакции проводились при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки и при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,6 В (отн. Ag/AgCl) в течение 30-90 мин. После проведения электрокаталитических

реакций 60 мкл реакционной смеси отбирались и наносились на поверхность немодифицированного ПГЭ с последующей регистрацией квадратно-волновых вольтамперограмм. Концентрации образующегося 4'-гидроксидиклофенака определяли по уравнению калибровочной зависимости амплитуды тока окисления этого соединения от его концентрации в стандартных растворах.

Определение электрокаталитической активности СУР2С9 по отношению к (S)-напроксену. ПГЭ с иммобилизованным СУР2С9 помещались в ячейку, заполненную 900 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации (S)-напроксена. СУР2С9-зависимые реакции проводились при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки и при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,550 В (отн. Ag/AgCl) в течение 30-60 мин. После проведения электрокаталитических реакций 60 мкл реакционной смеси отбирались и наносились на поверхность немодифицированного ПГЭ с последующей регистрацией квадратно-волновых вольтамперограмм. Концентрации образующегося (S)-О-десметилнапроксена определяли по уравнению калибровочной зависимости амплитуды тока окисления этого соединения от его концентрации в стандартных растворах.

Определение электрокаталитической активности СУР2С19 по отношению к фенитоину. ПГЭ с иммобилизованным СУР2С19 помещались в ячейку, заполненную 900 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации фенитоина. СУР2С19-зависимые реакции проводились при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки и при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,550 В (отн. Ag) в течение 30-90 мин. После проведения электрокаталитических реакций 60 мкл реакционной смеси отбирались и наносились на поверхность немодифицированного ПГЭ с последующей регистрацией квадратно-волновых вольтамперограмм. Концентрации образующегося 4-гидроксифенитоина определяли по уравнению калибровочной зависимости амплитуды тока окисления этого соединения от его концентрации в стандартных растворах.

Определение электрокаталитической активности СУР2Е1-содержащих бактосом по отношению к хлорзоксазону. ПГЭ с иммобилизованными бактосомами помещались в ячейку, заполненную 900 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl и различные концентрации хлорзоксазона. СУР2Е1-зависимые реакции проводились при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки и при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,550 В (отн. Ag/AgCl) в течение 30-90 мин. После проведения электрокаталитических реакций 60 мкл реакционной смеси отбирались и наносились на поверхность немодифицированного ПГЭ с последующей регистрацией квадратно-волновых вольтамперограмм. Концентрации образующегося 6-гидроксихлорзоксазона определяли по уравнению калибровочной зависимости амплитуды тока окисления этого соединения от его концентрации в стандартных растворах.

Определение электрокаталитической активности СУР3А4 по отношению к гидрокортизону. ПГЭ с иммобилизованным СУР3А4 помещались в ячейку, заполненную 300 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации гидрокортизона. СУР3А4-зависимые реакции проводились при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки и при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,6 В (отн. Ag/AgCl) в течение 5-60 мин. После проведения электрокаталитических реакций реакционная смесь переносилась в стеклянную пробирку и смешивалась с 600 мкл смеси серной кислоты и этанола (3:1 по объему). Полученный раствор инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и далее регистрировали спектр флуоресценции. Концентрацию образующегося 6β-гидрокортизола определяли по уравнению калибровочной зависимости интенсивности пика эмиссии при $\lambda_{em} 427 \pm 2$ нм от концентрации этого соединения в стандартных растворах.

Определение параметров стационарной кинетики биотрансформации исследуемых соединений при участии цитохромов P450. Начальные скорости электрокаталитических цитохром P450-зависимых реакций выражали как количество продукта (моль), образующегося за минуту, соотнесенное к количеству электроактивного цитохрома P450 на электроде (моль), что соответствовало размерности, равной мин^{-1} . Количество электроактивного цитохрома P450 было рассчитано в соответствии с уравнением 1. В случае определения начальной скорости реакции гидроксирования хлорзоксазона под действием иммобилизованных на электроде бактосом количество электроактивного СУР2Е1 было также рассчитано в соответствии с уравнением 1 и с учетом заявленного производителем молярного соотношения СУР2Е1 и $\text{сут } b_5$ в бактосомах. Для определения параметров стационарной кинетики цитохромов P450 в случае гиперболической зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата проводилась аппроксимация экспериментальных данных в соответствии с уравнением Михаэлиса-Ментен (2):

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}, \quad (2)$$

где V – начальная скорость реакции биотрансформации субстрата, мин^{-1} , $[S]$ – концентрация субстрата, M , K_M – константа Михаэлиса, M , V_{\max} – максимальная скорость реакции биотрансформации субстрата, мин^{-1} .

В случае бифазной зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата для определения параметров стационарной кинетики проводилась аппроксимация экспериментальных данных в соответствии с уравнением (3):

$$V = \frac{V_{\max 1}[S]}{K_{M1} + [S]} + \frac{V_{\max 2}[S]}{K_{M2} + [S]}, \quad (3)$$

где $V_{\max 1}$ – максимальная скорость реакции биотрансформации субстрата под действием формы фермента, образующей с субстратом комплекс с высокой аффинностью, мин^{-1} , K_{M1} – константа

Михаэлиса для формы фермента, образующей с субстратом комплекс с высокой аффинностью, M , $V_{\max 2}$ – максимальная скорость реакции биотрансформации субстрата под действием формы фермента, образующей с субстратом комплекс с низкой аффинностью, мин^{-1} , K_{M2} – константа Михаэлиса для формы фермента, образующей с субстратом комплекс с низкой аффинностью, M .

Математическая и статистическая обработка данных. Все представленные значения в работе получены по меньшей мере из трех независимых повторов экспериментов. Для каждого значения были рассчитаны стандартные отклонения с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2013. Экспериментальные зависимости были получены с помощью программного обеспечения Origin 7.5 или 8.1.

Предел определяемых концентраций аналитов рассчитывался с учетом трехкратного стандартного отклонения средней величины фонового сигнала.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методологии биэлектродной электрохимической системы для определения активности цитохромов P450

В данной части работы мы предложили методологию биэлектродной электрохимической системы для определения активности ряда клинически значимых цитохромов P450. Продукты цитохром P450-зависимых реакций ароматического гидроксирования, деалкилирования или ароматизации, приводящих к образованию производных, содержащих гидроксифенильные группы, могут быть определены за счет их прямого электрохимического окисления на электроде. При этом фермент находится в иммобилизованном состоянии на электроде, а инициирование каталитической реакции по отношению к субстрату осуществляется за счет электрохимического восстановления иона железа гема цитохрома P450. За счет способности образующихся продуктов ферментативных реакций окисляться при потенциалах, отличных от потенциалов окисления исходных субстратов, отсутствует необходимость разделения компонентов реакционной среды для количественного электрохимического определения продуктов реакций.

Мы рассмотрели реакции ароматизации андрогенов (андростендиона и тестостерона), катализируемые цитохромом CYP19A1, приводящие к образованию эстрогенов (эстрона и β -эстрадиола), реакции ароматического гидроксирования (*S*)-варфарина до (*S*)-7-гидроксиварфарина, диклофенака до 4'-гидроксициклофенака под действием CYP2C9, фенитоина до 4-гидроксифенитоина под действием CYP2C19, хлорзоксазона до 6-гидрокси-хлорзоксазона под действием CYP2E1, а также реакцию O-деметилирования (*S*)-напроксена до (*S*)-O-десметилнапроксена, катализируемую CYP2C9 (рисунок 1).

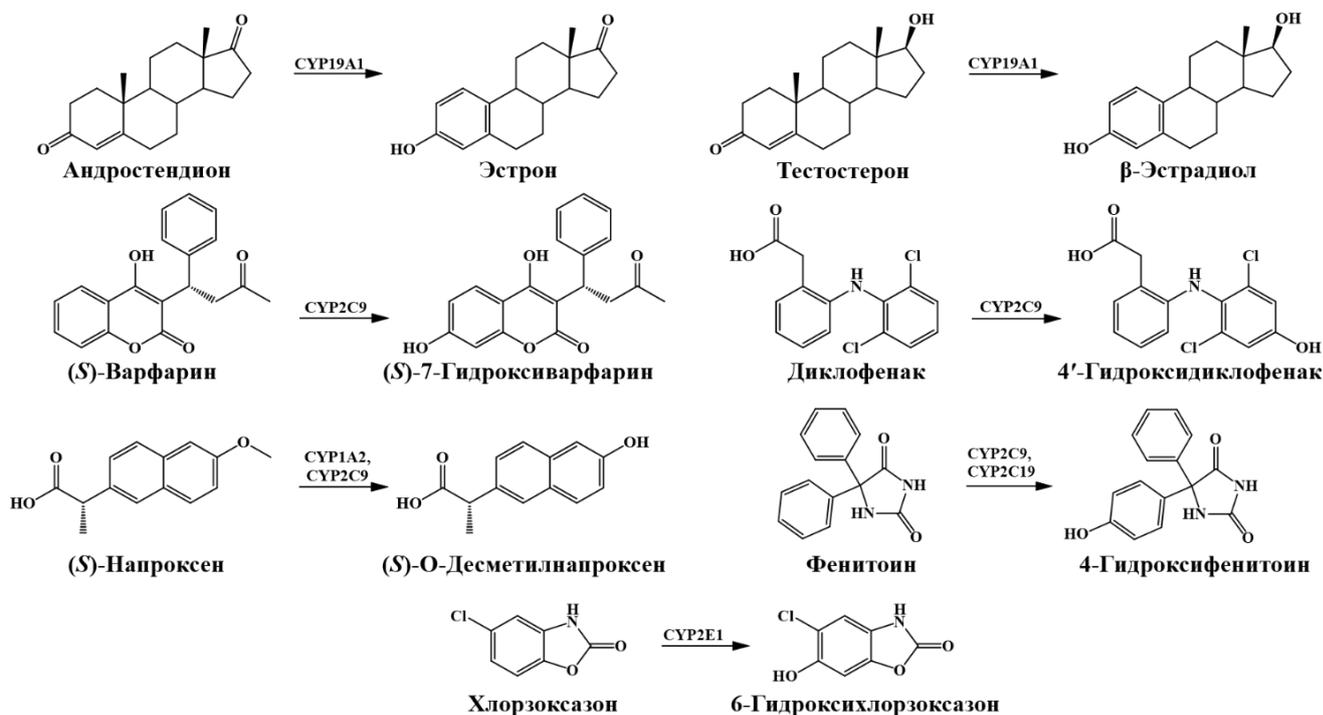


Рисунок 1. Схемы реакций, катализируемых цитохромами P450.

Методом циклической вольтамперометрии мы исследовали электрохимические свойства указанных выше субстратов и продуктов соответствующих цитохром P450-зависимых реакций (рисунок 2). В таблице 1 представлены потенциалы пиков окисления, полученные из циклических вольтамперограмм для субстратов и продуктов цитохром P450-зависимых реакций. Пики окисления эстрона, β -эстрадиола и (S)-О-десметилнапроксена в области 0,5 В, (S)-7-гидроксиварфарина, 4-гидроксифенитоина в области 0,6, 4'-гидроксидиклофенака в области 0,3 В и 6-гидросихлорзоксана в области 0,2 В соответствуют электрохимическому окислению гидроксифенильных групп в составе этих соединений, при этом субстраты, из которых образуются соответствующие продукты под действием цитохромов P450, не окисляются при данных потенциалах. Таким образом, мы показали, что продукты цитохром P450-зависимых реакций ароматизации, ароматического гидроксирования и деалкилирования, приводящих к образованию гидроксифенильных производных, могут быть зарегистрированы по характеристическим пикам окисления при потенциалах, отличных от потенциалов окисления исходных субстратов. Потенциалы и амплитуды пиков окисления продуктов реакций в смеси с соответствующими субстратами аналогичны этим характеристикам пиков окисления продуктов, регистрируемых в отсутствие субстрата. Последнее обстоятельство указывает на возможность количественного электрохимического определения продуктов без применения дополнительных методов разделения анализируемой смеси.

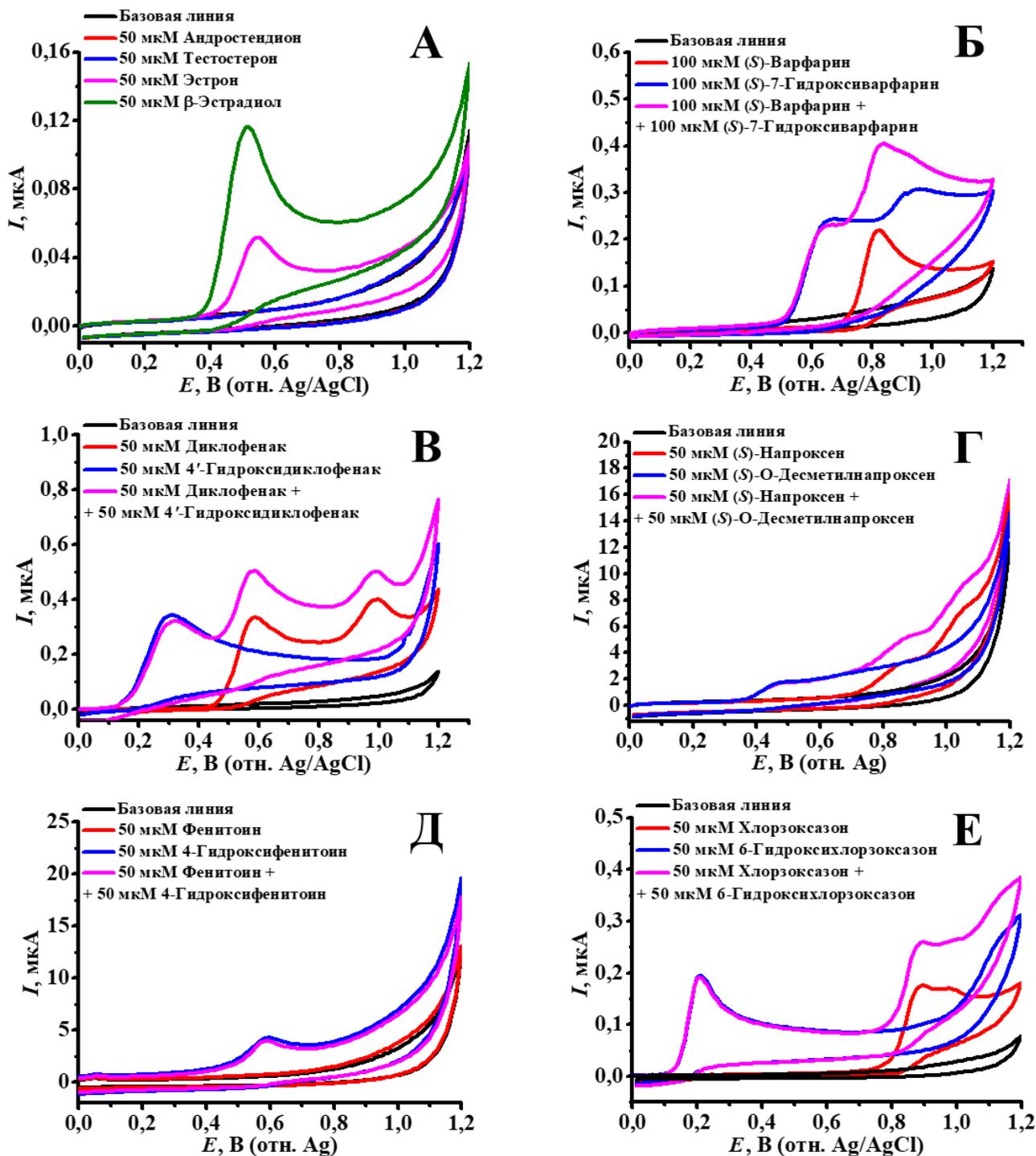


Рисунок 2. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl (—) и 50 мкМ андростендион (—), 50 мкМ тестостерон (—), 50 мкМ эстрон (—) или 50 мкМ β-эстрадиол (—) (А); 100 мкМ (S)-варфарин (—), 100 мкМ (S)-7-гидроксиварфарин (—) или их смесь (—) (Б); 50 мкМ диклофенак (—), 50 мкМ 4'-гидроксидиклофенак (—) или их смесь (—) (В); 50 мкМ (S)-напроксен (—), 50 мкМ (S)-О-десметилнапроксен (—) или их смесь (—) (Г); 50 мкМ фенитоин (—), 50 мкМ 4-гидроксифенитоин (—) или их смесь (—) (Д); 50 мкМ хлорзоксазон (—), 50 мкМ 6-гидроксихлорзоксазон (—) или их смесь (—) (Е). При регистрации циклических вольтамперограмм, кроме представленных на рисунке Е, буфер содержал 1% метанол (по объему). Скорость сканирования 100 мВ/с.

Таблица 1. Потенциалы пиков окисления субстратов и продуктов цитохром Р450-зависимых реакций, полученные из циклических вольтамперограмм.

Субстрат	Потенциал пика окисления*, В	Продукт	Потенциал пика окисления*, В
Андростендион	-	Эстрон	0,546
Тестостерон	-	β-Эстрадиол	0,517
(S)-Варфарин	0,820	(S)-7-Гидроксиварфарин	0,600
			0,900
Диклофенак	0,587	4'-Гидроксидиклофенак	0,320
	0,992		
(S)-Напроксен	0,850	(S)-О-Десметилнапроксен**	0,492
	1,035		0,762
			1,129
Фенитоин	-	4-Гидроксифенитоин	0,595
Хлорзоксазон	0,892 В	6-Гидроксихлорзоксазон	0,207
	0,972 В		0,891
			1,114

Прочерк обозначает, что пиков окисления в диапазоне потенциалов от 0 до 1,2 В не зарегистрировано. * Для (S)-напроксена, (S)-О-десметилнапроксена, фенитоина и 4-гидроксифенитоина значения потенциалов приводятся относительно Ag электрода сравнения, в остальных случаях относительно Ag/AgCl электрода сравнения. ** Для (S)-О-десметилнапроксена потенциалы пиков окисления получены после вычитания циклической вольтамперограммы, зарегистрированной в буфере, содержащем (S)-О-десметилнапроксен, из циклической вольтамперограммы, зарегистрированной в буфере, не содержащем (S)-О-десметилнапроксен.

Количественное электрохимическое определение продуктов цитохром Р450-зависимых реакций

Для разработки методик количественного определения продуктов цитохром Р450-зависимых реакций мы использовали метод квадратно-волновой вольтамперометрии, позволяющий снижать емкостное сопротивление и увеличивать отношение сигнал/шум, что важно при регистрации малых концентраций продуктов, образующихся в электрохимической системе при проведении электрокаталитических цитохром Р450-зависимых реакций. Аналитическим пиком для всех метаболитов служил пик окисления гидроксифенильных групп продуктов цитохром Р450-зависимых реакций.

Для эстрона и β -эстрадиола потенциалы пиков окисления их гидроксифенильных групп были зарегистрированы при $0,497 \pm 0,014$ В и $0,483 \pm 0,017$ В (отн. Ag/AgCl), соответственно (рисунки 3 А и 3 В). Зависимости токов окисления эстрона и β -эстрадиола от их концентраций в буфере (от 0 до 2,5 мкМ) имели линейный характер (рисунки 3 Б и 3 Г). Для (*S*)-7-гидроксиварфарина аналитический пик был зарегистрирован при $0,590 \pm 0,020$ В (отн. Ag/AgCl). Амплитуда пика окисления линейно зависела от концентрации (*S*)-7-гидроксиварфарина (от 0,1 до 1 мкМ) (рисунки 4 А и 4 Б). Одним из эффективных способов увеличения чувствительности электрохимического анализа и снижения пределов определяемых концентраций аналитов является модификация электродов углеродными наноматериалами [Michalkiewicz и соавт., 2021]. Для определения 4'-гидроксидиклофенака мы использовали ПГЭ, модифицированные ОУНТ. На квадратно-волновых вольтамперограммах для 4'-гидроксидиклофенака (от 0,1 до 1 мкМ), зарегистрированных с помощью модифицированных электродов, мы наблюдали концентрационно-зависимые пики окисления в области $0,110 \pm 0,010$ В (отн. Ag/AgCl) (рисунок 5 А). На немодифицированных электродах регистрируются аналогичные концентрационно-зависимые пики, но с потенциалами окисления $0,275 \pm 0,025$ В (отн. Ag/AgCl) (рисунок 5 В). Смещение потенциала пика окисления 4'-гидроксидиклофенака в сторону отрицательных значений на электродах, модифицированных ОУНТ, по сравнению с потенциалом аналогичного пика, регистрируемого на немодифицированных электродах, указывает на каталитические свойства ОУНТ. Амплитуда пиков окисления 4'-гидроксидиклофенака как на модифицированных, так и на немодифицированных электродах линейно зависела от концентрации этого аналита (рисунки 5 Б и 5 Г, соответственно). Потенциал аналитического пика окисления (*S*)-О-десметилнапроксена регистрировался при $0,400 \pm 0,020$ В (отн. Ag) (рисунок 6 А). Зависимость тока окисления (*S*)-О-десметилнапроксена от концентрации этого соединения (0,3-1 мкМ) была линейной (рисунок 6 Б). Для 4-гидроксифенитоина был зарегистрирован аналитический пик при $0,602 \pm 0,018$ В (отн. Ag) (рисунок 7 А). Зависимость тока пика окисления 4-гидроксифенитоина от концентрации этого соединения (от 0,1 до 1 мкМ) имела линейный характер (рисунок 7 Б). Пик окисления гидроксифенильной группы 6-гидрокси-хлорзоксазона был зарегистрирован в области $0,203 \pm 0,022$ В (отн. Ag/AgCl) (рисунок 8 А). Зависимость тока пика окисления от концентрации 6-гидрокси-хлорзоксазона (от 0,1 до 1 мкМ) имела линейный характер.

В таблице 2 представлены аналитические характеристики количественного электрохимического определения продуктов цитохром Р450-зависимых реакций, полученные с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии.

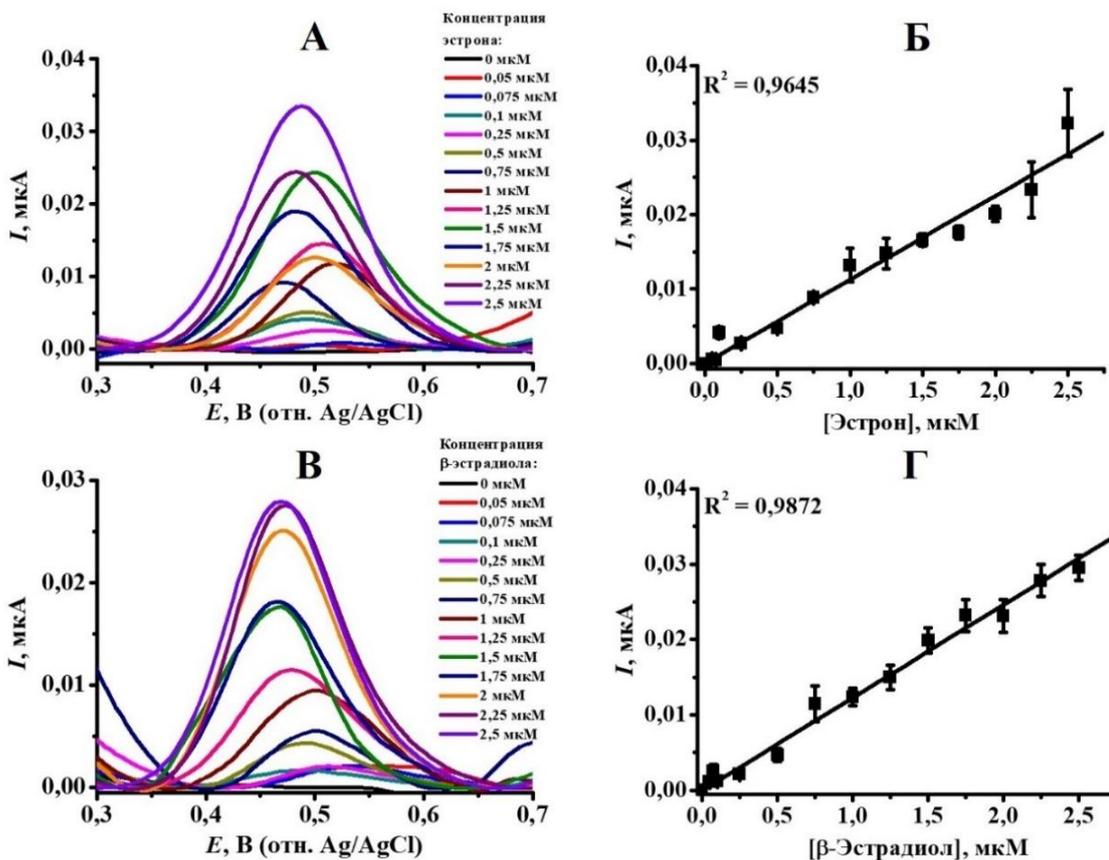


Рисунок 3. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации (от 0 до 2,5 мкМ) эстрона (А) или β-эстрадиола (В). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ. Зависимости тока окисления от концентраций эстрона (Б) или β-эстрадиола (Г). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов ± стандартные отклонения.

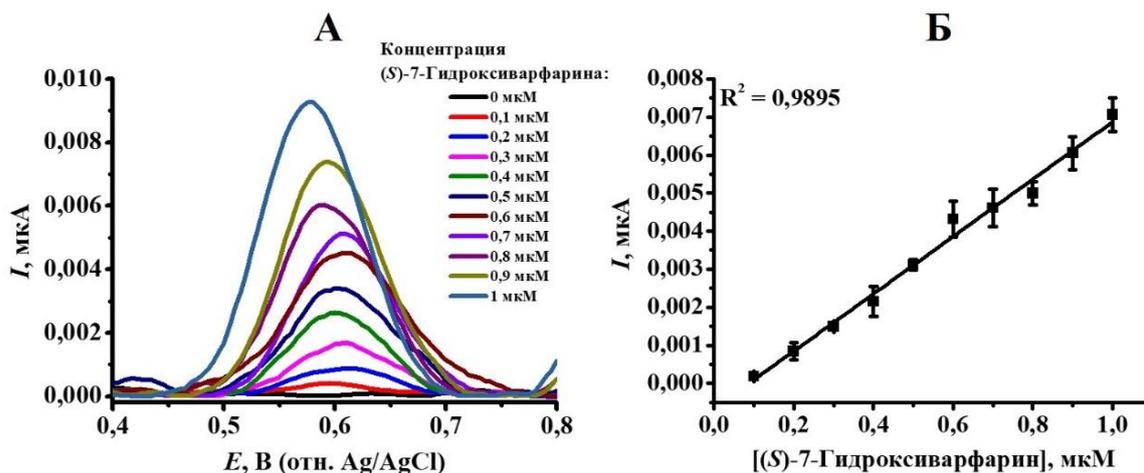


Рисунок 4. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации (S)-7-гидроксиварфарина (от 0 до 1 мкМ) (А). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ. Зависимость тока пика окисления от концентрации (S)-7-гидроксиварфарина (Б). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов ± стандартные отклонения.

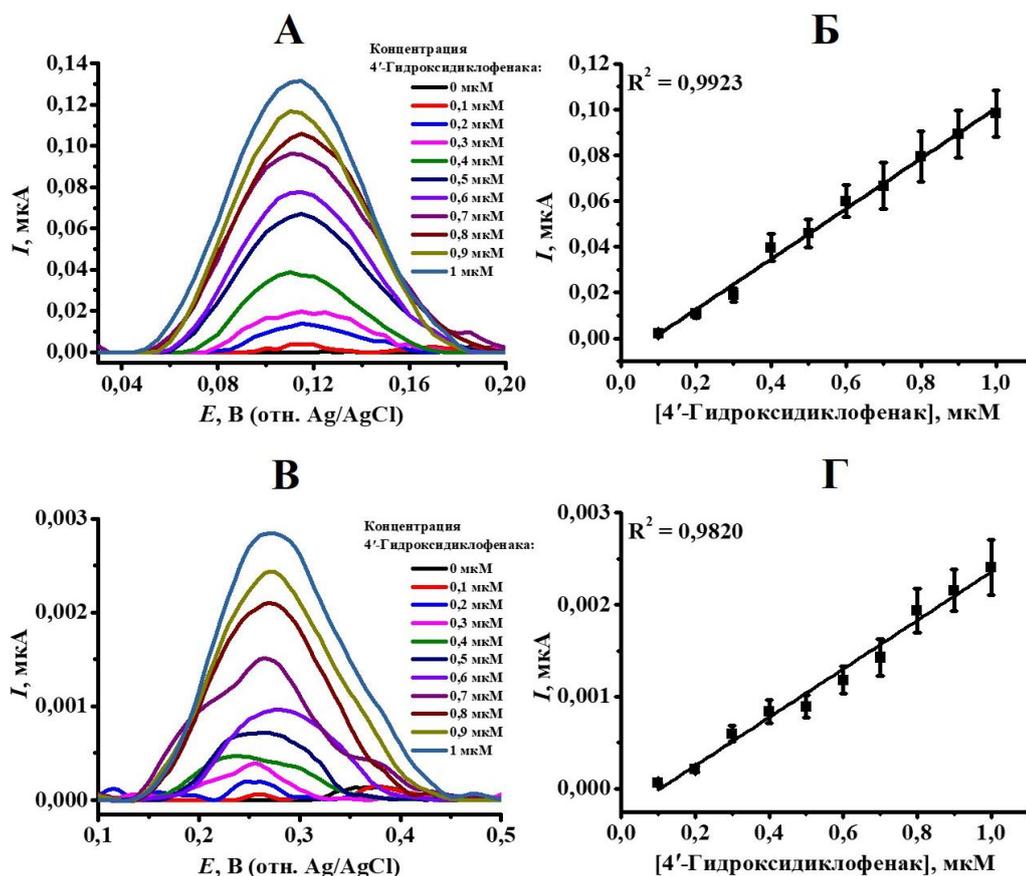


Рисунок 5. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированных ОУНТ (А), и немодифицированных ОУНТ (В) в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации 4'-гидроксидиклофенака (от 0 до 1 мкМ). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ. Зависимости тока пика окисления на ПГЭ, модифицированных ОУНТ (Б), и немодифицированных ОУНТ (Г) от концентрации 4'-гидроксидиклофенака. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов \pm стандартные отклонения.

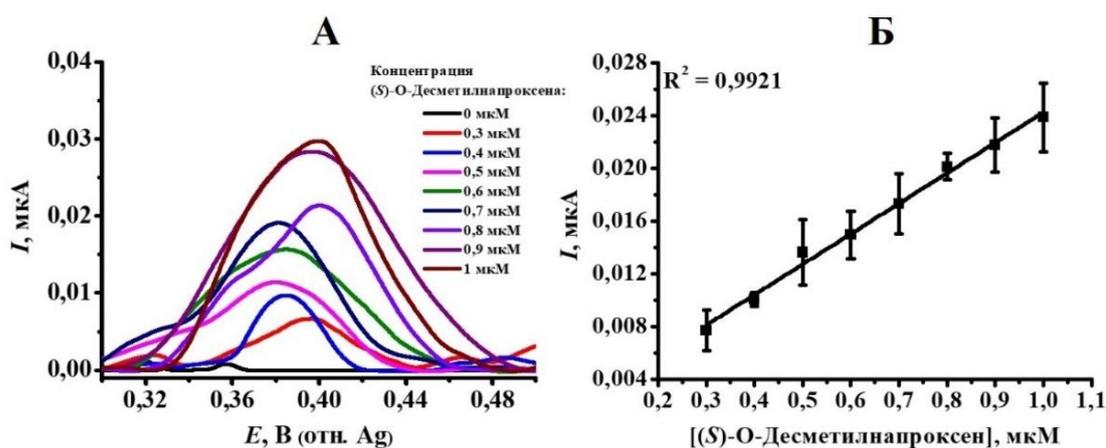


Рисунок 6. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации (S)-О-десметилнапроксена (от 0 до 1 мкМ) (А). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ. Зависимость тока пика окисления от концентрации (S)-О-десметилнапроксена (Б). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов \pm стандартные отклонения.

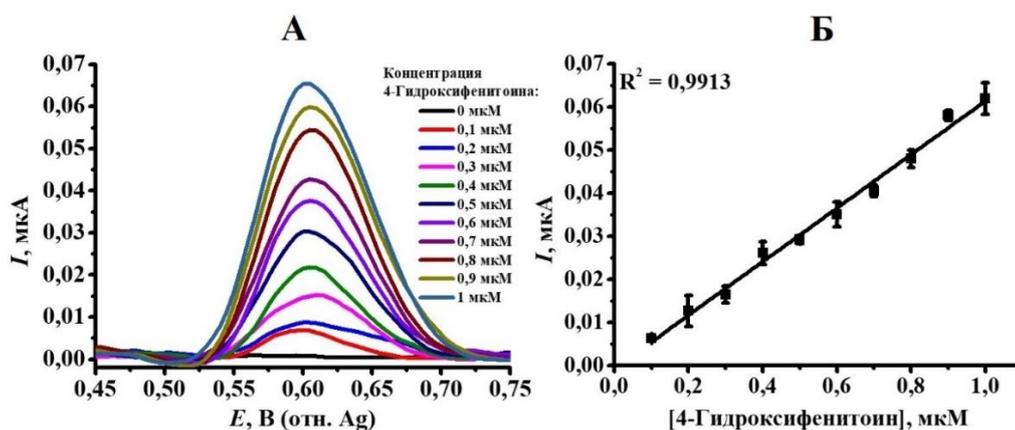


Рисунок 7. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации (от 0 до 1 мкМ) 4-гидроксифенитоина (А). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ. Зависимость тока пика окисления от концентрации 4-гидроксифенитоина (Б). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов \pm стандартные отклонения.

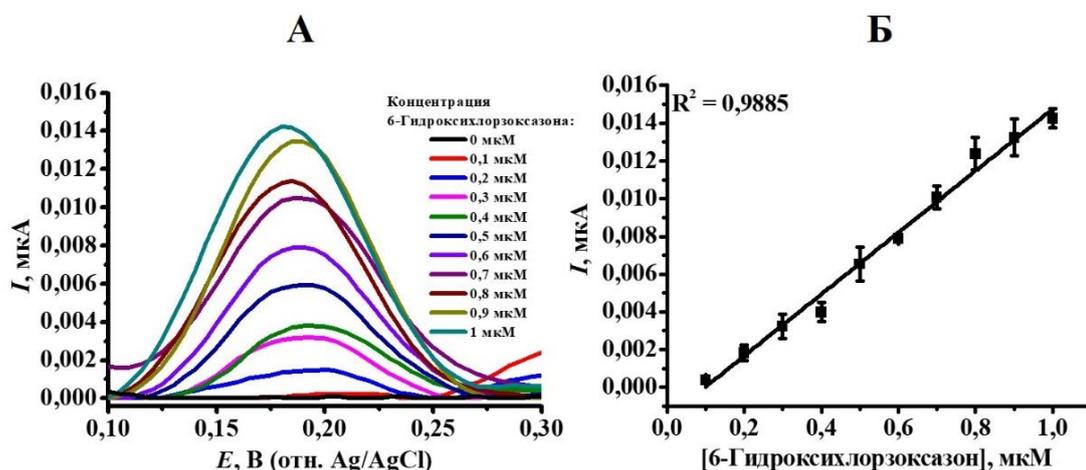


Рисунок 8. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и различные концентрации (от 0 до 1 мкМ) 6-гидроксицлозоксазона (А). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ. Зависимость тока пика окисления от концентрации 6-гидроксицлозоксазона (Б). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов \pm стандартные отклонения.

Таблица 2. Аналитические характеристики количественного электрохимического определения продуктов цитохром Р450-зависимых реакций, полученные с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии.

Соединение	Потенциал аналитического пика окисления, В*	Линейный диапазон, мкМ	Чувствительность, мкА/мкА	Предел определяемых концентраций, нМ
Эстрон	$0,497 \pm 0,014$	0-2,5	0,010	11

Продолжение таблицы 2

β-Эстрадиол	0,483 ± 0,017	0,05-2,5	0,012	3,4
(S)-7- Гидроксиварфарин	0,590 ± 0,020	0,1-1	0,0075	91
4'- Гидроксидиклофенак	0,110 ± 0,010**	0,1-1	0,11	85
	0,275 ± 0,025	0,1-1	0,003	120
(S)-O- Десметилнапроксен	0,400 ± 0,020	0,3-1	0,023	290
4-Гидроксифенитоин	0,602 ± 0,018	0,1-1	0,062	40
6- Гидроксихлорзоксазон	0,203 ± 0,022	0,1-1	0,016	110

* Для (S)-O-десметилнапроксена и 4-гидроксифенитоина значения потенциалов приводятся относительно Ag электрода сравнения, в остальных случаях относительно Ag/AgCl электрода сравнения. ** Потенциал пика окисления 4'-гидроксидиклофенака, полученный с помощью электродов, модифицированных ОУНТ.

Как видно в таблице 2, модификация электродов ОУНТ увеличивает чувствительность и снижает предел определяемых концентраций 4'-гидроксидиклофенака.

Разработанные методики количественного определения продуктов ферментативных реакций использовались далее для исследования кинетики цитохром P450-зависимых реакций с помощью биэлектродной системы.

Биэлектродная система для определения каталитической активности CYP19A1

CYP19A1 катализирует последовательную трехстадийную реакцию биосинтеза эстрогенов – эстрона и β-эстрадиола – из андрогенов – андростендиона и тестостерона, соответственно [Sohl, Guengerich, 2010]. Ингибиторы CYP19A1 являются эффективными препаратами, применяющимися для лечения рака молочной железы [Hamadeh и соавт., 2018]. Поиск новых эффективных ингибиторов CYP19A1 проводится по настоящее время, что обуславливает необходимость применения высокопроизводительных систем для скрининга их ингибиторной активности.

Мы предложили новый подход к определению активности CYP19A1 с помощью биэлектродной системы. Один из электродов этой системы был модифицирован ДДАБ и служил для иммобилизации рекомбинантного фермента и электрохимического восстановления его иона железа гема, при этом второй (немодифицированный) электрод использовался для количественного определения образующихся в процессе ферментативной реакции эстрогенов путем их прямого электрохимического окисления (рисунок 9).

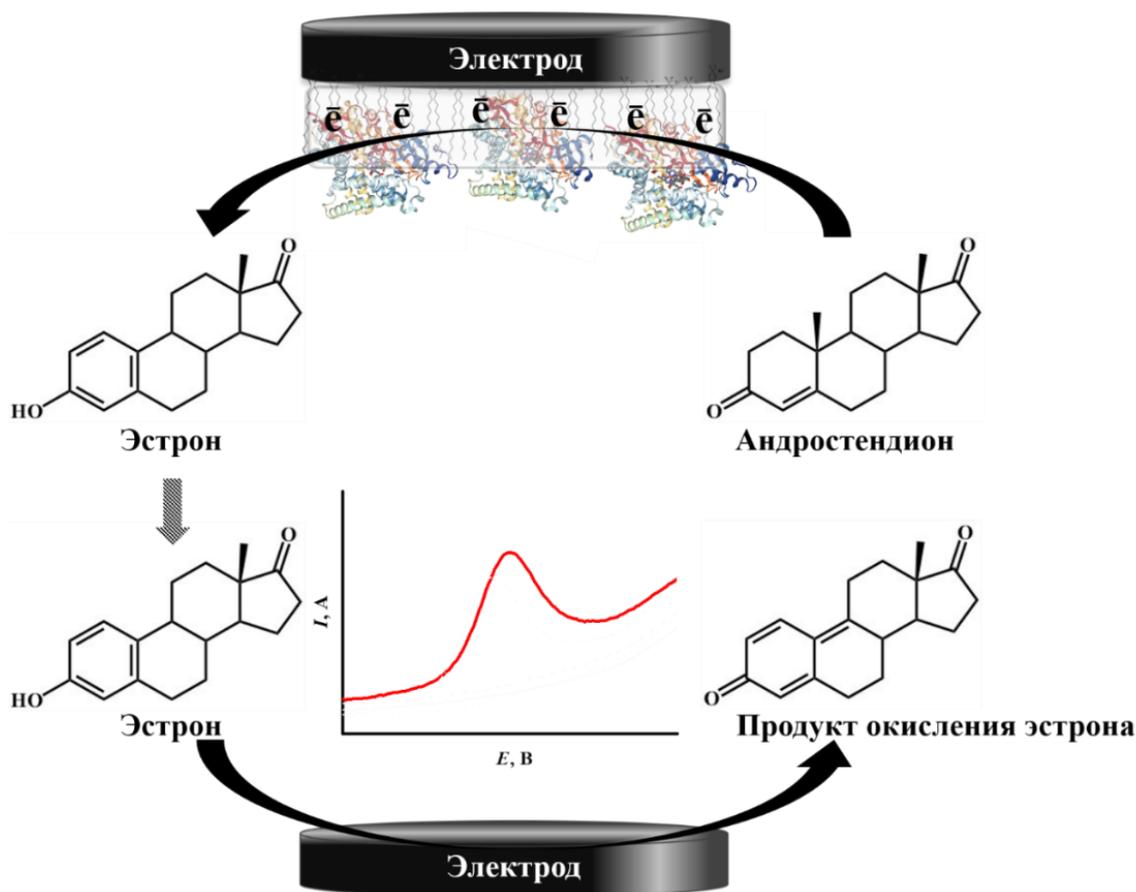


Рисунок 9. Биэлектродная электрохимическая система для определения активности СYP19A1. Один из электродов (на рисунке сверху) модифицирован ДДАБ и служит для иммобилизации СYP19A1 и электрохимического восстановления иона железа гема фермента, второй электрод (на рисунке снизу) служит для регистрации методом квадратно-волновой вольтамперометрии образующегося из андростендиона в процессе ферментативной реакции эстрогена путем его прямого электрохимического окисления.

Мы оценили возможность определения с помощью биэлектродной системы активности СYP19A1, иммобилизованного на электроде. Электрокаталитические реакции по отношению к 10 мкМ андростендиону и 10 мкМ тестостерону проводили при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,6 В (отн. Ag/AgCl) в течение 30 мин. В качестве контроля проводились электрокаталитические реакции при тех же условиях и с теми же субстратами в электрохимической системе с электродами, модифицированными ДДАБ, но без иммобилизованного СYP19A1. На квадратно-волновых вольтамперограммах, представленных на рисунках 10 А и 10 Б, видно, что после проведения реакций как с ферментным электродом, так и с электродом без фермента в области потенциалов окисления эстрона и β -эстрадиола регистрируются пики. Значения токов окисления эстрона и β -эстрадиола в случае проведения электрокаталитической реакции в присутствии СYP19A1 превышают соответствующие значения токов окисления, регистрируемых после проведения электрокаталитической реакции в системе, не содержащей фермент, в 5 раз и 1,5 раза, соответственно. Полученные данные указывают на протекание как фермент-зависимого, так и

фермент-независимого процесса образования продуктов, окисляющихся в области окисления эстрогенов, однако СYP19A1 вносит основной вклад в образование таких продуктов. По-видимому, регистрируемые после проведения реакции с электродом без фермента пики окисления соответствуют продуктам, образующимся при неферментативной электрокаталитической реакции.

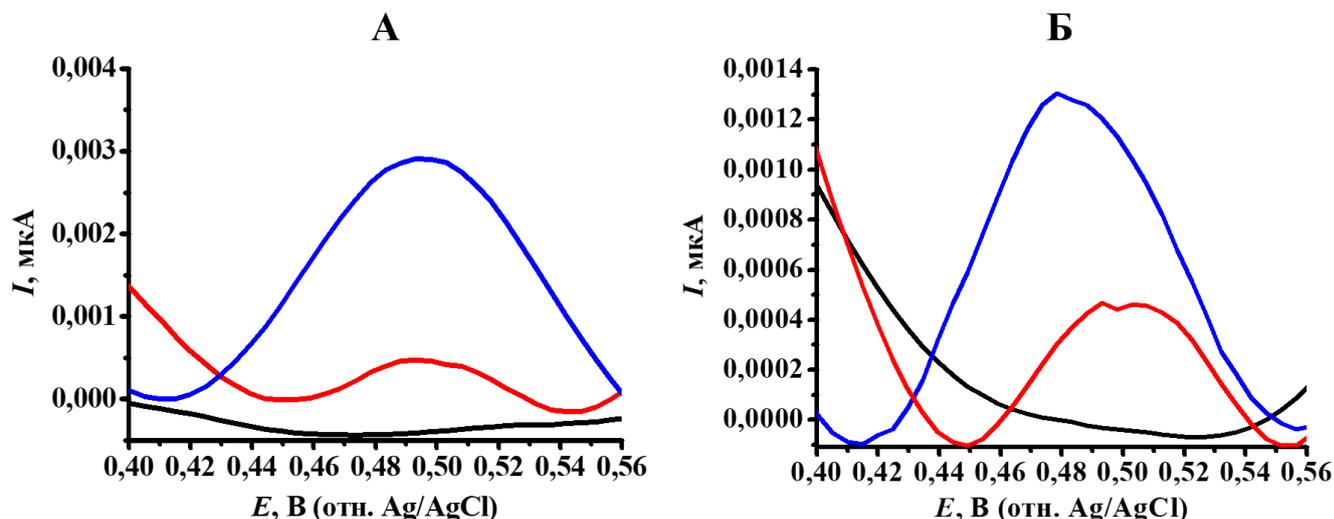


Рисунок 10. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 10 мкМ андростендион (А) или 10 мкМ тестостерон (Б), до (—) или после проведения электрокаталитической реакции в течение 30 мин при фиксированном потенциале -0,6 В (отн. Ag/AgCl) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ (—) и с иммобилизованным СYP19A1 (—). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ.

Для определения параметров стационарной кинетики СYP19A1 по отношению к андростендиону и тестостерону мы определили начальные скорости реакций образования эстрона и β -эстрадиола, регистрируемые по электрохимическому окислению соответствующих эстрогенов (рисунки 11 А и 11 Б). Зависимости начальных скоростей образования эстрона и β -эстрадиола от концентраций андростендиона и тестостерона имели гиперболический характер. Значения V_{max} реакций образования эстрона и β -эстрадиола были рассчитаны как $51,6 \pm 7,2 \text{ мин}^{-1}$ и $10,2 \pm 1,2 \text{ мин}^{-1}$, соответственно. Значения K_M СYP19A1 в электрохимической системе по отношению к андростендиону и тестостерону были определены как $4,2 \pm 1,5 \text{ мкМ}$ и $3,8 \pm 1,3 \text{ мкМ}$, соответственно. Эффективности катализа СYP19A1 в электрохимической системе, выраженные как V_{max}/K_M , по отношению к андростендиону и тестостерону составили $12,29 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$ и $2,68 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$, соответственно.

Для сравнения в таблице 3 представлены кинетические параметры СYP19A1 по отношению к андростендиону, полученные с помощью электрохимической и реконструированной систем.

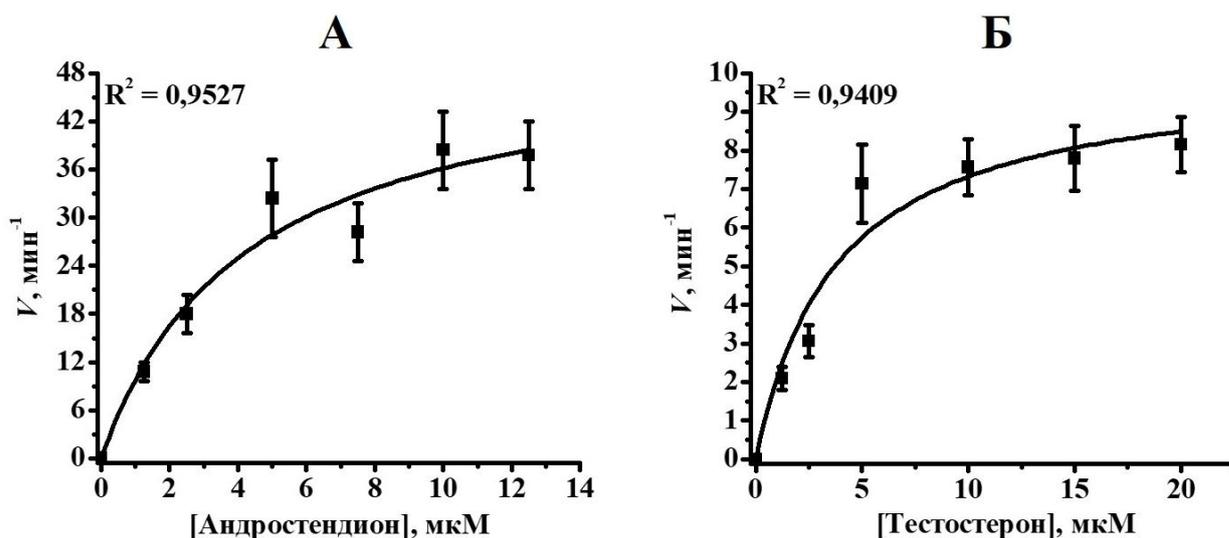


Рисунок 11. Зависимости начальной скорости СУР19А1-зависимого образования эстрогена от концентрации андростендиона (А) и β -эстрадиола от концентрации тестостерона (Б) в электрохимической системе. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов \pm стандартные отклонения

Таблица 3. Кинетические параметры СУР19А1 по отношению к андростендиону, полученные с помощью электрохимической и реконструированной систем.

Ферментативная система	V_{\max} , мин^{-1}	K_M , μM	V_{\max}/K_M , $\text{мин}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
Электрохимическая	$51,6 \pm 7,2$	$4,2 \pm 1,5$	12,29
Реконструированная*	$3,6 \pm 0,18$	$0,044 \pm 0,006$	81,82

* По данным работы Sohl, Guengerich, 2010.

Как видно в таблице 3, значение V_{\max} биотрансформации андростендиона в реконструированной системе приблизительно на порядок меньше V_{\max} в электрохимической системе. Данные различия могут быть обусловлены активирующим влиянием на СУР19А1 пероксида водорода, генерируемого в процессе электрокаталитической реакции. Кроме того, в электрохимической системе процесс восстановления цитохрома Р450 не лимитирован переносом электронов по электрон-транспортной цепи, а зависит от скорости переноса электронов между электродом и ионом железа гема фермента, что также может влиять на скорость ферментативного процесса. Значение K_M СУР19А1 по отношению к андростендиону в реконструированной системе приблизительно на два порядка меньше значения K_M фермента в электрохимической системе. Увеличение K_M может быть связано с определенной ориентацией и/или конформацией фермента на электроде и менее эффективным взаимодействием субстрата с активным центром, по сравнению с взаимодействием в реконструированной системе. V_{\max}/K_M по отношению к андростендиону в реконструированной системе приблизительно в 7 раз больше, чем аналогичный параметр в электрохимической системе.

На примере экземестана мы продемонстрировали возможность применения разработанной электрохимической системы на основе СУР19А1 для исследования ингибиторов этого фермента. Экземестан имеет андростендион-подобную структуру и способен подвергаться конверсии при участии СУР19А1 с образованием метаболита, ингибирующего ароматазу [Lombardi, 2002] (ингибирование, основанное на механизме действия). Основными параметрами, характеризующими такой тип ингибирования, являются максимальное значение константы скорости инактивации фермента (k_{inact}) и концентрация ингибитора, которая необходима для инактивации фермента на 50% (K_I). Зависимость между этими параметрами определяется уравнением 4 [Zhang и соавт., 2005]:

$$k_{obs} = \frac{k_{inact} [I]}{K_I + [I]}, \quad (4)$$

где k_{obs} – константа скорости инактивации фермента при определенной концентрации ингибитора, мин^{-1} , k_{inact} – максимальное значение константы скорости инактивации фермента, мин^{-1} , $[I]$ – концентрация ингибитора, М, K_I – концентрация ингибитора, которая необходима для инактивации фермента на 50%, М.

Мы провели СУР19А1-зависимые электрокаталитические реакции в диапазоне времени от 0 до 10 мин по отношению к экземестану (0-10000 нМ) с целью время-зависимого образования метаболита, инактивирующего фермент. После проведения электрокаталитических реакций была определена остаточная активность СУР19А1 по отношению к 10 мкМ андростендиону (рисунок 12).

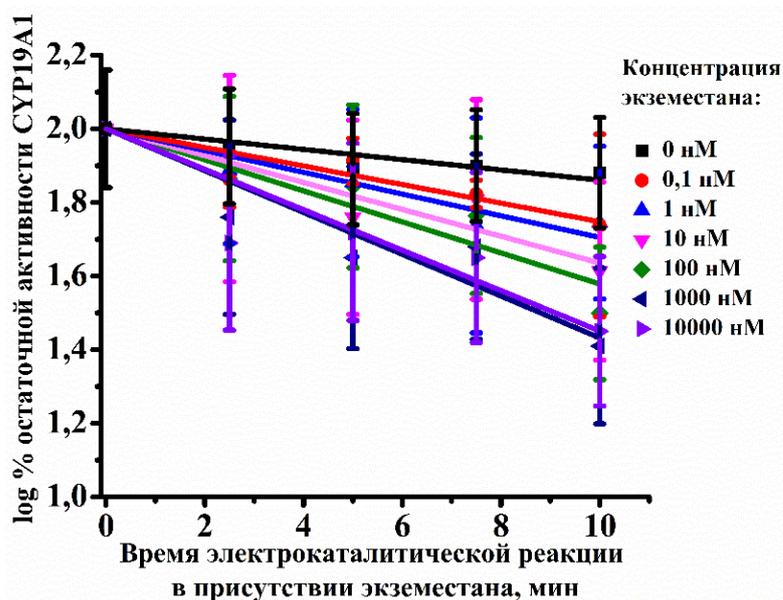


Рисунок 12. Зависимости логарифма процента остаточной активности ($\log \%$ остаточной активности) СУР19А1 по отношению к андростендиону от времени СУР19А1-зависимой электрокаталитической реакции в присутствии различных концентраций экземестана (0-10000 нМ). Реакции по отношению к экземестану проводились в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации экземестана (от 0 до 10000 нМ). Реакции по отношению к андростендиону проводились в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 10 мкМ андростендион. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов \pm стандартные отклонения.

Из представленных на рисунке 12 зависимостей логарифма процента остаточной активности СУР19А1 по отношению к андростендиону от времени электрокаталитической реакции в присутствии различных концентраций экземестана были определены тангенсы углов наклонов, соответствующие значениям k_{obs} . Значение тангенса угла наклона зависимости логарифма процента остаточной активности СУР19А1 от времени электрокаталитической реакции при концентрации экземестана 0 нМ вычиталось из тангенсов углов наклонов зависимостей, полученных при концентрациях экземестана от 0,1 нМ до 10000 нМ. Таким образом, были определены значения Δk_{obs} .

Для расчета значений k_{inact} и K_I методом нелинейной регрессии была получена зависимость Δk_{obs} от концентрации экземестана (рисунок 13).

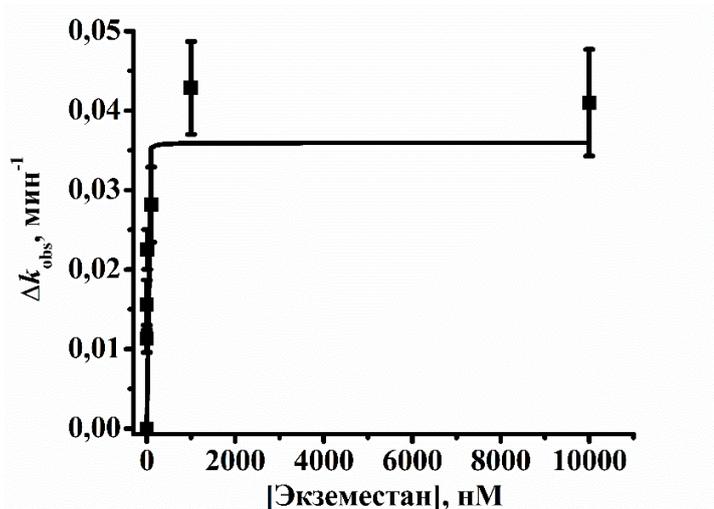


Рисунок 13. Зависимость значений Δk_{obs} от концентрации экземестана (0-10000 нМ). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов \pm стандартные отклонения.

Значение k_{inact} было определено как $0,038 \pm 0,003$ мин⁻¹. Время полуинактивации ($t_{1/2}$) СУР19А1 в присутствии экземестана рассчитывалось в соответствии с уравнением 5 [Ghanbari и соавт., 2006]:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{inact}}, \quad (5)$$

где $t_{1/2}$ – время полуинактивации фермента в присутствии необратимого ингибитора, мин, \ln – натуральный логарифм.

Значение $t_{1/2}$ было определено как $18,2 \pm 1,4$ мин. Ранее $t_{1/2}$ для ингибирования СУР19А1 экземестаном было определено как $13,9 \pm 0,7$ мин [Di Salle и соавт., 1990], и, таким образом, полученный нами параметр $t_{1/2}$ сопоставим с аналогичным параметром, установленным ранее с помощью альтернативной ферментативной системы. Значение K_I находится в диапазоне 0,3-5,7 нМ экземестана. Ранее аналогичный параметр был определен с помощью альтернативной ферментативной системы как $26,0 \pm 1,4$ нМ [Di Salle и соавт., 1990].

Таким образом, мы показали, что биэлектродная система может применяться для определения активности СУР19А1 и исследования ингибиторов этого фермента.

Биэлектродная система для определения каталитической активности CYP2C9

Варфарин – антикоагулянт, ингибирующий витамин К эпоксид-редуктазу и широко применяющийся в клинической практике в виде рацемата *R* и *S* энантиомеров [Косаеl и соавт., 2019]. Основным метаболитом (*S*)-варфарина, образующимся под действием CYP2C9, является (*S*)-7-гидроксиварфарин [Kaminsky, Zhang, 1997; Silverman, Holladay, 2014]. Полиморфизм гена CYP2C9, приводящий к образованию ферментов с измененной активностью, повышает риск развития кровотечений при приеме варфарина [Samardzija и соавт., 2008; Liedtke, Rathbun, 2010]. Кроме того, ряд лекарственных препаратов может изменять метаболизм варфарина, ингибируя CYP2C9 [Liedtke, Rathbun, 2010; Zanger, Schwab, 2013].

Мы оценили возможность с помощью биэлектродной системы определять активность CYP2C9 по отношению к (*S*)-варфарину. CYP2C9 был иммобилизован на поверхности ПГЭ, модифицированных ДДАБ. Мы провели ферментативную электрокаталитическую реакцию по отношению к 50 мкМ (*S*)-варфарину при контролируемом потенциале рабочего электрода -0,6 В (отн. Ag) в течение 60 мин. В качестве контрольного эксперимента мы провели электрокаталитическую реакцию по отношению к 50 мкМ (*S*)-варфарину в течение 60 мин, используя электрод, модифицированный ДДАБ, без фермента. На рисунке 14 показано, что после электрокаталитической реакции с ферментным электродом регистрируется пик электрохимического окисления в области потенциалов окисления (*S*)-7-гидроксиварфарина, тогда как после проведения электрокаталитической реакции без фермента на электроде пик электрохимического окисления в данной области отсутствует. Таким образом, можно сделать вывод о том, что в электрохимической системе образование (*S*)-7-гидроксиварфарина происходит при участии CYP2C9.

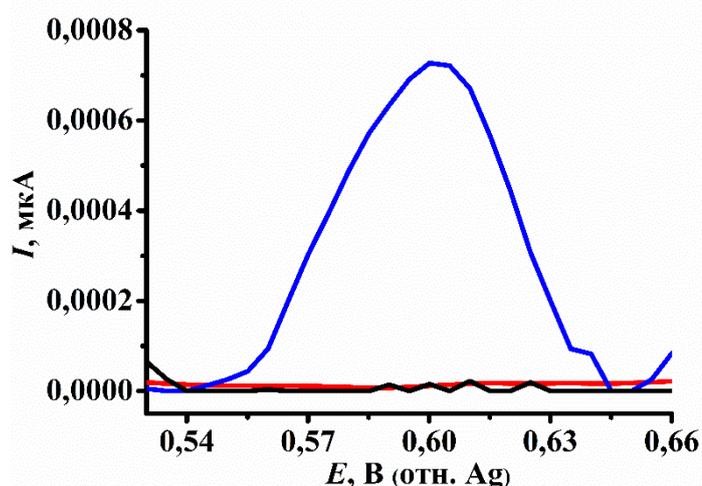


Рисунок 14. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 50 мкМ (*S*)-варфарин, до (—) или после проведения электрокаталитической реакции в течение 60 мин при фиксированном потенциале -0,6 В (отн. Ag) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ (—) и с иммобилизованным CYP2C9 (—). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ.

Зависимость начальной скорости образования (*S*)-7-гидроксиварфарина под действием иммобилизованного СУР2С9 от концентрации (*S*)-варфарина в электрохимической системе имела гиперболический характер (рисунок 15).

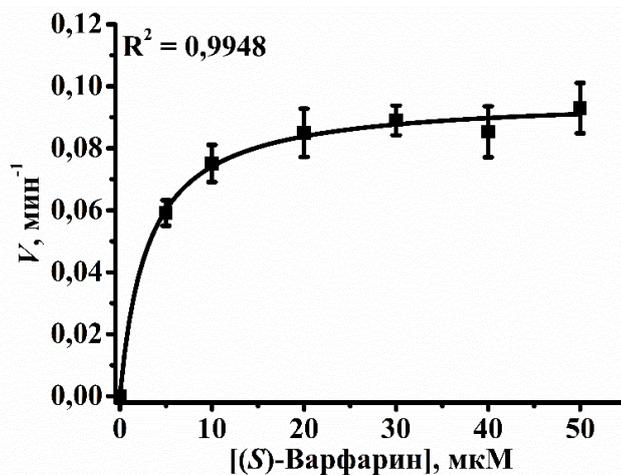


Рисунок 15. Зависимость начальной скорости СУР2С9-зависимого образования (*S*)-7-гидроксиварфарина от концентрации (*S*)-варфарина в электрохимической системе. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов ± стандартные отклонения.

В таблице 4 представлены кинетические параметры СУР2С9 по отношению к (*S*)-варфарину, полученные с помощью электрохимической и альтернативных ферментативных систем.

Таблица 4. Кинетические параметры СУР2С9 по отношению к (*S*)-варфарину, полученные с помощью электрохимической и альтернативных систем.

Ферментативная система	V_{max} , мин ⁻¹	K_M , мкМ	V_{max}/K_M , мин ⁻¹ мкМ ⁻¹
Электрохимическая	0,100 ± 0,002	3,03 ± 0,38	0,033
Альтернативные*	0,0641-1,8	2,5-18	0,0122-0,61

* По данным работ Yamazaki и соавт., 1998, Mosher и соавт., 2008, Tatsumi и соавт., 2009, Liu и соавт., 2012 и Du и соавт., 2016.

Как видно в таблице 4, полученные с помощью электрохимической системы кинетические параметры СУР2С9 по отношению к (*S*)-варфарину были сопоставимы с аналогичными параметрами, полученными с помощью других СУР2С9-зависимых систем.

Далее мы оценили возможность применения биэлектродной системы для определения активности СУР2С9 по отношению к диклофенаку, который под действием фермента гидроксилируется до 4'-гидроксидиклофенака.

Мы провели электрокаталитическую реакцию с СУР2С9, иммобилизованным на ПГЭ, модифицированном ДДАБ, в присутствии 100 мкМ диклофенака при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,6 В (отн. Ag/AgCl) в течение 90 мин (рисунок 16). В качестве контроля

электрокаталитическая реакция была проведена при тех же условиях и с той же концентрацией диклофенака с ПГЭ, модифицированным ДДАБ, но без фермента. Определения образующегося 4'-гидроксидиклофенака проводилось с помощью электродов, модифицированных ОУНТ.

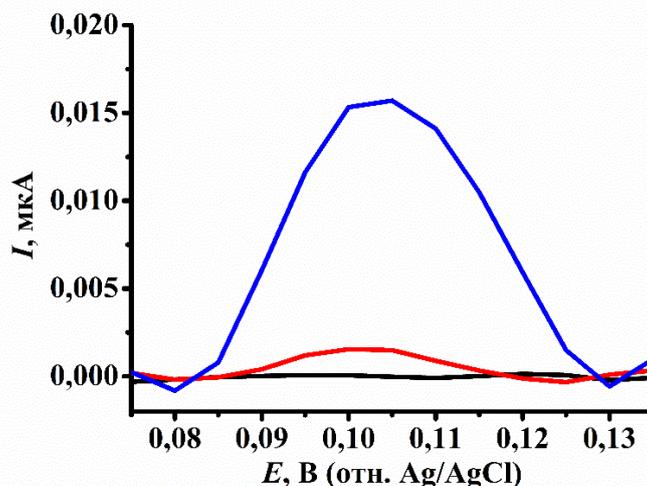


Рисунок 16. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированных ОУНТ, в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 100 мкМ диклофенак, до (—) или после проведения электрокаталитической реакции в течение 90 мин при фиксированном потенциале -0,6 В (отн. Ag/AgCl) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ (—) и с иммобилизованным СУР2С9 (—). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ.

Как видно на рисунке 16, после проведения электрокаталитической реакции с ферментным электродом регистрируется пик в области потенциалов окисления 4'-гидроксидиклофенака. После проведения электрокаталитической реакции без фермента также регистрируется пик в области потенциалов окисления 4'-гидроксидиклофенака, но со значительно меньшей амплитудой, по сравнению с амплитудой, регистрируемой после проведения электрокаталитической реакции с ферментом. Данный пик может указывать на наличие гидроксильных молекул диклофенака, образующихся под действием активных форм кислорода, генерируемых в процессе электрокаталитического восстановления кислорода. Таким образом, мы показали, что основной вклад в формирование 4'-гидроксидиклофенака в электрохимической системе вносит СУР2С9, иммобилизованный на электроде.

Зависимость начальной скорости СУР2С9-зависимого образования 4'-гидроксидиклофенака от концентрации диклофенака имела гиперболический характер (рисунок 17). В таблице 5 представлены кинетические параметры СУР2С9 по отношению к диклофенаку, полученные с помощью электрохимической и других СУР2С9-содержащих систем.

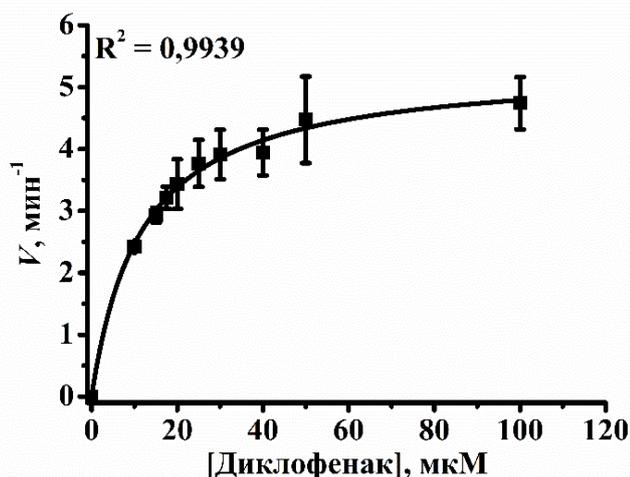


Рисунок 17. Зависимость начальной скорости СУР2С9-зависимого образования 4'-гидроксидиклофенака от концентрации диклофенака в электрохимической системе. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов \pm стандартные отклонения.

Таблица 5. Кинетические параметры СУР2С9 по отношению к диклофенаку, полученные с помощью электрохимической и альтернативных систем.

Ферментативная система	V_{\max} , мин ⁻¹	K_M , мкМ	V_{\max}/K_M , мин ⁻¹ мкМ ⁻¹
Электрохимическая	$5,35 \pm 0,13$	$11,66 \pm 0,92$	0,46
Альтернативные*	14,8-37,2	2,33-30	0,9-11,71

* По данным работ Guo и соавт., 2005, Kumar и соавт., 2006 и Zi и соавт. 2010.

Из данных, представленных в таблице 5, можно заключить, что полученные с помощью электрохимической системы значения V_{\max} и V_{\max}/K_M меньше диапазонов аналогичных параметров, полученных с помощью альтернативных СУР2С9-содержащих систем. По-видимому, это связано с менее выгодной для взаимодействия с диклофенаком конформацией и/или ориентацией фермента, иммобилизованного на электроде, по сравнению с таковыми для СУР2С9 в растворе.

Чтобы показать возможность применения разработанного нами подхода для исследования ингибиторов СУР2С9, мы использовали в качестве известного ингибитора этого изофермента цитохрома Р450 сульфafenазол [Bourgié и соавт., 1996; Zheng и соавт., 2020]. Для определения типа и константы ингибирования (K_i) сульфafenазолом диклофенак-гидроксилазной активности СУР2С9 мы использовали метод Диксона [Dixon, 1953] (рисунок 18). Характер зависимостей, представленный на рисунке 18, указывает на конкурентный или смешанный тип ингибирования фермента. Общая точка пересечения соответствует значению K_i $0,22 \pm 0,03$ мкМ. Ранее с помощью микросомальной системы было показано, что сульфafenазол ингибирует 4'-гидроксилирование диклофенака по конкурентному типу, а значение K_i было определено как $0,11 \pm 0,08$ мкМ [Leemann и соавт., 1993]. Следовательно, полученные нами параметры ингибирования сульфafenазолом

активности CYP2C9 в электрохимической системе согласуются с аналогичными параметрами, полученными с помощью микросомальной ферментативной системы.

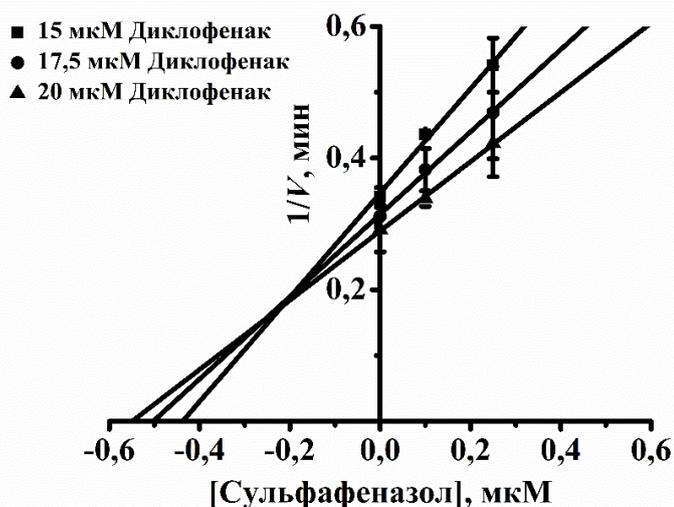


Рисунок 18. Зависимости обратных значений начальных скоростей CYP2C9-зависимого образования 4'-гидроксидиклофенака (при концентрациях диклофенака 15 мкМ (■), 17,5 мкМ (●) или 20 мкМ (▲)) от концентрации сульфазеназола в электрохимической системе. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов \pm стандартные отклонения.

Таким образом, мы показали, что разработанная биэлектродная система может применяться для выявления ингибиторов CYP2C9.

Наряду с реакциями ароматического гидроксирования большое количество субстратов цитохромов P450 подвергается реакциям деалкилирования с образованием гидроксифенильных групп в составе метаболитов. Образующиеся метаболиты с гидроксифенильной группой способны электрохимически окисляться при потенциалах, отличных от потенциалов окисления исходных субстратов. Такими субстратами являются многие лекарственные соединения, среди которых напроксен, ингибирующий циклооксигеназу 1 и 2 [Kim и соавт., 2014]. Напроксен подвергается метаболизму главным образом при участии цитохрома P450 1A2 (CYP1A2) и CYP2C9 [Rodrigues и соавт., 1996; Miners и соавт., 1996; Tracy и соавт., 1997].

Мы оценили возможность определения с помощью биэлектродной системы O-деметилазной активности CYP2C9, иммобилизованного на ПГЭ, модифицированных ДДАБ, по отношению к (S)-напроксену. CYP2C9-зависимая электрокаталитическая реакция проводилась в течение 60 мин при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,550 В (отн. Ag) и концентрации (S)-напроксена 1500 мкМ (рисунок 19). В качестве контрольного эксперимента мы провели электрокаталитическую реакцию в присутствии 1500 мкМ (S)-напроксена при аналогичных условиях с ПГЭ, модифицированным ДДАБ, без иммобилизованного фермента.

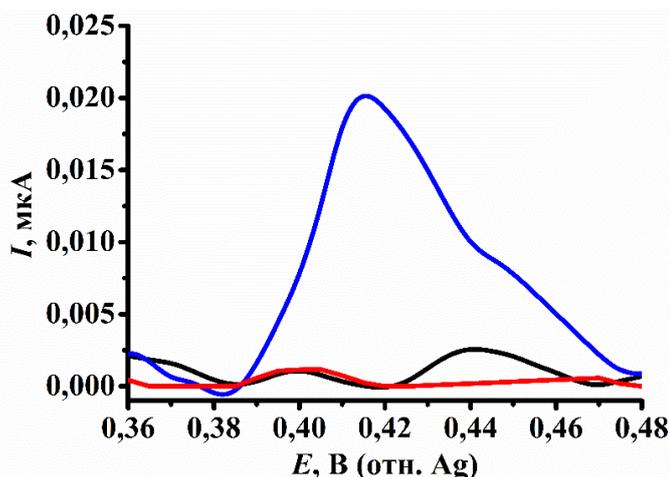


Рисунок 19. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 1500 мкМ (*S*)-напроксен, до (—) или после проведения электрокаталитической реакции в течение 60 мин при фиксированном потенциале -0,550 В (отн. Ag) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ (—) и с иммобилизованным СУР2С9 (—). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ.

После проведения электрокаталитической реакции с иммобилизованным на электроде СУР2С9 по отношению к 1500 мкМ (*S*)-напроксену регистрируется пик окисления в области потенциалов, соответствующих окислению (*S*)-О-десметилнапроксена. Также после проведения электрокаталитической реакции по отношению к 1500 мкМ (*S*)-напроксену с электродом без иммобилизованного фермента в области 0,4 В (отн. Ag), соответствующей окислению (*S*)-О-десметилнапроксена, наблюдается пик, значение тока которого меньше значения предела определяемых концентраций для (*S*)-О-десметилнапроксена. Аналогичный пик присутствует и на квадратно-волновой вольтамперограмме, зарегистрированной в инкубационной смеси, содержащей 1500 мкМ (*S*)-напроксен, до проведения электрокаталитической реакции. Таким образом, в отсутствие фермента на электроде, образование (*S*)-О-десметилнапроксена, количество которого превышало бы значение предела определяемых концентраций, не происходит. Это свидетельствует о преимущественном вкладе СУР2С9, иммобилизованного на электроде, в образование (*S*)-О-десметилнапроксена.

Зависимость начальной скорости реакции О-деметилирования (*S*)-напроксена от концентрации (*S*)-напроксена имела гиперболический характер (рисунок 20 А). В соответствии с линеаризацией по методу Иди-Хофсти, мы получили линейный характер зависимости V от $V/[S]$, свидетельствующий о связывании одной молекулы субстрата с активным центром фермента (рисунок 20 Б). Однако ранее в работах Korzekwa и соавт., 1998, Трасу и соавт., 2002, Hummel и соавт. 2004, Kumar и соавт., 2006 было показано, что зависимость начальной скорости СУР2С9-зависимого О-деметилирования напроксена от его концентрации имеет бифазный характер, свидетельствующий об одновременном

взаимодействии двух молекул субстрата с активным центром фермента. С другой стороны, в работах McGinnity и соавт. 1999, McDonald и соавт., 2020 и Henderson и соавт., 2021 авторы не отмечали, что кинетический профиль фермента по отношению к напроксену имел бифазный характер.

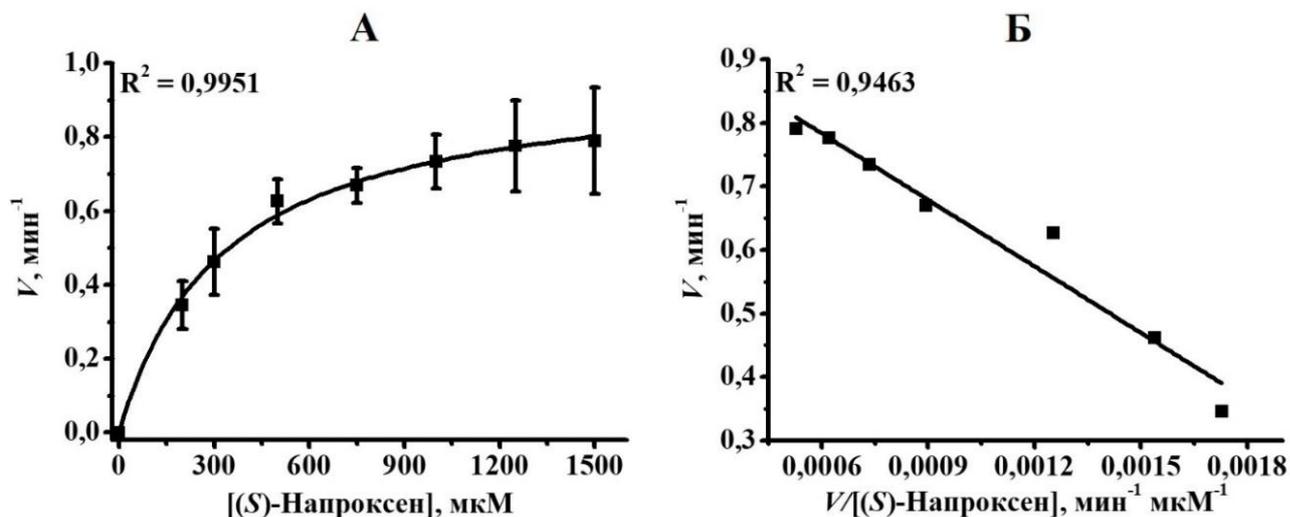


Рисунок 20. Зависимость начальной скорости CYP2C9-зависимого образования (S)-О-десметилнапроксена от концентрации (S)-напроксена в электрохимической системе (А) и зависимость V от $V/[S]$ -напроксен] (координаты Иди-Хофсти) (Б). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов \pm стандартные отклонения.

Для сравнения в таблице 6 представлены кинетические параметры CYP2C9 по отношению к (S)-напроксену, полученные с помощью электрохимической и альтернативных CYP2C9-содержащих систем в случае гиперболической зависимости V от концентрации (S)-напроксена.

Таблица 6. Кинетические параметры CYP2C9 по отношению к (S)-напроксену, полученные с помощью электрохимической и альтернативных CYP2C9-содержащих систем в случае гиперболической зависимости V от концентрации (S)-напроксена.

Ферментативная система	V_{\max} , мин ⁻¹	K_M , мкМ	V_{\max}/K_M , мин ⁻¹ мкМ ⁻¹
Электрохимическая	$0,98 \pm 0,03$	331 ± 30	0,003
Альтернативные*	4,9-31,7	116-419	0,022-0,11

* По данным работ McGinnity и соавт. 1999, McDonald и соавт. 2020 и Henderson и соавт., 2021.

Стоит отметить относительно низкие значения V_{\max} и V_{\max}/K_M CYP2C9 по отношению к (S)-напроксену, полученные с помощью электрохимической системы, по сравнению с аналогичными параметрами стационарной кинетики, полученными в работах, упомянутых выше. Это, как и в случае с дикофенаком, может быть связано с менее выгодной для взаимодействия с (S)-напроксеном конформацией и/или ориентацией фермента, иммобилизованного на электроде, по сравнению с аналогичными характеристиками CYP2C9 в растворе.

Биэлектродная система для определения каталитической активности CYP2C19

Фенитоин – широко используемый противоэпилептический препарат, участвующий в большом количестве межлекарственных взаимодействий [Nakajima и соавт., 2002]. В большей степени метаболизм фенитоина осуществляется путем 4-гидроксилирования за счет CYP2C9 и в меньшей степени за счет CYP2C19 [Giancarlo и соавт., 2001; Nakajima и соавт., 2002]. Ранее отмечалось, что метаболизм фенитоина в микросомальной системе с оверэкспрессированным CYP2C9 или CYP2C19 характеризуется отклонением от гиперболической зависимости начальной скорости образования 4-гидроксифенитоина от концентрации фенитоина, при этом данная зависимость хорошо описывается уравнением для двух ферментов или двух сайтов связывания субстратов [Giancarlo и соавт., 2001].

Стоит отметить, что выявление атипичных профилей биотрансформации позволяет спрогнозировать фармакокинетику и оценить дозировку лекарственных соединений в условиях *in vitro*. В данной части работы мы оценили возможность с помощью биэлектродной системы выявлять атипичные профили биотрансформации субстратов цитохрома P450 на примере биотрансформации фенитоина под действием иммобилизованного на электроде CYP2C19. Электрокаталитическая реакция проводилась в присутствии 150 мкМ фенитоина при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,550 В (отн. Ag) в течение 90 мин. В качестве контрольного эксперимента при аналогичных условиях была проведена электрокаталитическая реакция с модифицированным электродом без иммобилизованного фермента. После проведения электрокаталитической реакции с ферментным электродом на квадратно-волновой вольтамперограмме был зарегистрирован пик в области 0,6 В (отн. Ag), соответствующий электрохимическому окислению 4-гидроксифенитоина, при этом после проведения электрокаталитической реакции с модифицированным электродом без иммобилизованного фермента пиков в области окисления 4-гидроксифенитоина, значение токов которых было бы выше значения тока, соответствующего пределу определяемых концентраций 4-гидроксифенитоина, не наблюдалось (рисунок 21). Таким образом, мы показали, что основной вклад в образование 4-гидроксифенитоина в электрокаталитической системе вносит CYP2C19, иммобилизованный на электроде. Мы также оценили влияние ингибитора CYP2C19 флуконазола на активность иммобилизованного на электроде фермента по отношению к 150 мкМ фенитоину. При концентрации флуконазола 1 мкМ и вышеуказанных условиях проведения электрокаталитической реакции наблюдалось уменьшение тока пика окисления в области 0,6 В (отн. Ag), что соответствовало снижению активности фермента в 2,8 раз, по сравнению с активностью фермента в отсутствие флуконазола.

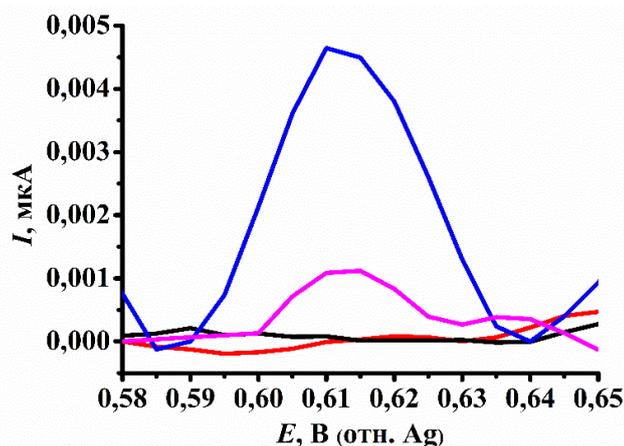


Рисунок 21. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 150 мкМ фенитоин, до (—) или после проведения электрокаталитической реакции в течение 90 мин при фиксированном потенциале -0,6 В (отн. Ag) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ (—) и с иммобилизованным СУР2С19, в отсутствие (—) или в присутствии 1 мкМ флуконазола (—). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ.

Зависимость начальной скорости реакции СУР2С19-зависимого гидроксирования фенитоина от его концентрации в электрохимической системе описывалась уравнением 3 для бифазной кинетики (рисунок 22 А). Мы провели линейризацию зависимости начальной скорости реакции образования 4-гидроксифенитоина от концентрации фенитоина в соответствии с методом Иди-Хофсти. Зависимость V от $V/[S]$ имела два линейных участка, что указывает на бифазную кинетику гидроксирования фенитоина (рисунок 22 Б). Ранее аналогичный характер зависимости скорости образования 4-гидроксифенитоина от концентрации фенитоина наблюдался в микросомах, содержащих СУР2С19 [Giancarlo и соавт., 2001].

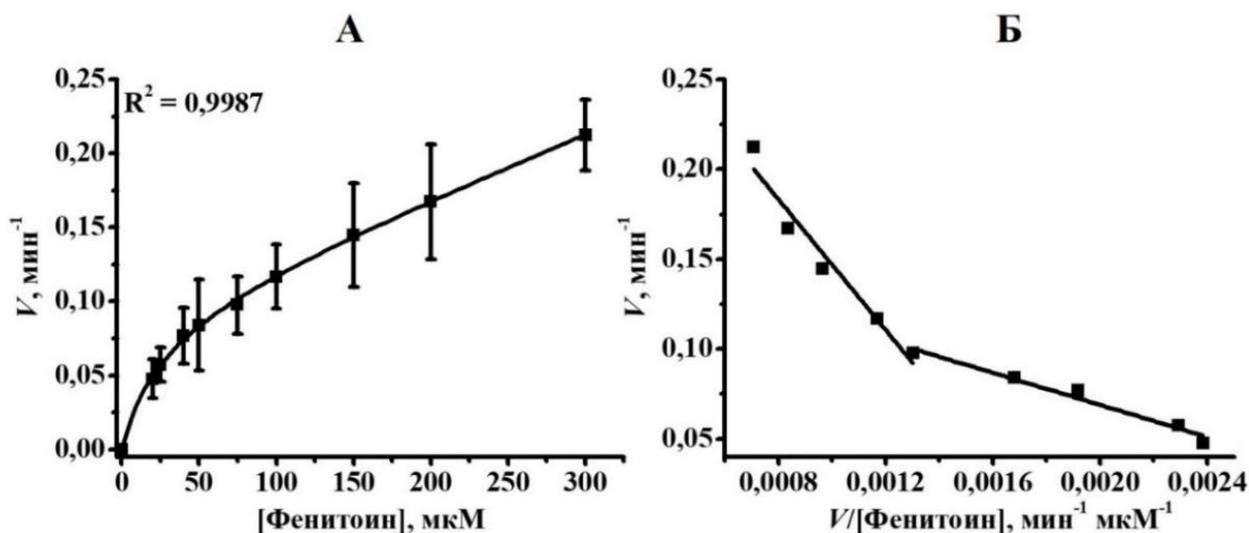


Рисунок 22. Зависимость начальной скорости СУР2С19-зависимого образования 4-гидроксифенитоина от концентрации фенитоина в электрохимической системе (А) и зависимость V от $V/[Фенитоин]$ (координаты Иди-Хофсти) (Б). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов \pm стандартные отклонения.

В таблице 7 представлены кинетические параметры CYP2C19 по отношению к фенитоину в электрохимической и микросомальной ферментативных системах.

Таблица 7. Кинетические параметры CYP2C19 по отношению к фенитоину, полученные с помощью электрохимической и микросомальной систем.

Ферментативная система	V_{max1} , мин ⁻¹	K_{M1} , мкМ	V_{max1}/K_{M1} , мин ⁻¹ мкМ ⁻¹	V_{max2}/K_{M2} , мин ⁻¹ мкМ ⁻¹
Электрохимическая	0,094 ± 0,002	25,8 ± 2,0	0,0036	0,00042
Микросомальная*	0,085	24,1	0,0035	0,00029

* По данным работы Giancarlo и соавт., 2001.

Таким образом, мы показали, что биэлектродная система может использоваться для исследования субстратов с атипичной кинетикой биотрансформации под действием цитохромов P450.

Биэлектродная система для определения каталитической активности CYP2E1 по отношению к хлорзоксазону

Маркерным субстратом CYP2E1 является хлорзоксазон – миорелаксант центрального действия, метаболизм которого при участии этого фермента происходит с образованием 6-гидроксихлорзоксазона [Peter и соавт., 1990; Mehvar, Vuppugalla, 2006].

В данной части работы мы оценили возможность использования биэлектродной системы для определения активности мембраносвязанного CYP2E1. Один из электродов системы был модифицирован ДДАБ и использовался для иммобилизации бактосом, представляющих собой мембранную фракцию, полученную из *Escherichia coli*, содержащую CYP2E1 человека, CPR и *cyt b5* человека, другой электрод системы использовался для количественного определения образующегося 6-гидроксихлорзоксазона путем его электрохимического окисления на электроде. При иммобилизации бактосом CYP2E1 находится в мембранном окружении и в присутствии своих природных редокс партнерных белков (CPR и *cyt b5*), что позволяет достичь максимальной стабильности фермента.

Анализ редокс-потенциалов иммобилизованных бактосом позволил установить, что ион железа гема CYP2E1 и *cyt b5*, а также флавиновые кофакторы CPR способны подвергаться прямому электрохимическому восстановлению электронами с электрода.

Мы провели электрокаталитическую реакцию с иммобилизованными на электроде бактосомами в течение 60 мин в присутствии 500 мкМ хлорзоксазона при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,550 В (отн. Ag/AgCl), при котором происходит электрохимическое восстановление как CYP2E1 и *cyt b5*, так и CPR. В качестве контрольного эксперимента мы провели

электрокаталитическую реакцию в присутствии 500 мкМ хлорзоксазона при аналогичных условиях с электродом, модифицированным ДДАБ, но без иммобилизованных бактосом. Как видно на рисунке 23, после проведения электрокаталитической реакции с бактосомами в области потенциалов окисления 6-гидроксихлорзоксазона регистрируется пик. При этом после проведения электрокаталитической реакции с электродом без бактосом в области потенциалов окисления 6-гидроксихлорзоксазона регистрируется пик со значением тока примерно в 6 раз меньше, по сравнению со значением тока, регистрируемого после проведения электрокаталитической реакции по отношению к хлорзоксазону с иммобилизованными на электроде бактосомами. Это свидетельствует о преимущественном вкладе иммобилизованных бактосом в образование 6-гидроксихлорзоксазона. Зависимость начальной скорости образования 6-гидроксихлорзоксазона от концентрации хлорзоксазона под действием иммобилизованных на электроде бактосом имела гиперболический характер (рисунок 24).

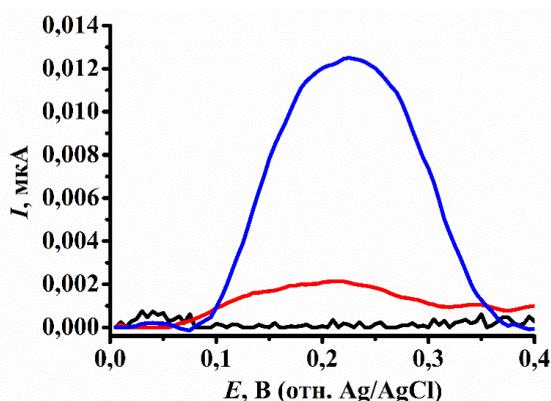


Рисунок 23. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и 500 мкМ хлорзоксазон, до (—) или после проведения электрокаталитической реакции в течение 60 мин при фиксированном потенциале $-0,550$ В (отн. Ag/AgCl) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ (—) и с иммобилизованными бактосомами, содержащими СУР2Е1 (—). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ.

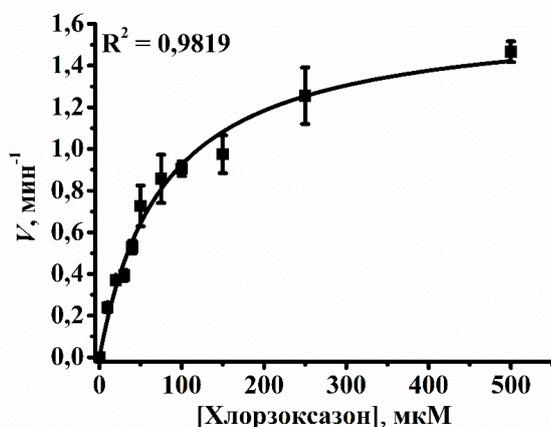


Рисунок 24. Зависимость начальной скорости СУР2Е1-зависимого образования 6-гидроксихлорзоксазона от концентрации хлорзоксазона в электрохимической системе. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов \pm стандартные отклонения.

В таблице 8 представлены кинетические параметры СУР2Е1 в бактосомах, полученные с помощью электрохимической и NADPH-зависимой систем.

Таблица 8. Кинетические параметры СУР2Е1 в бактосомах по отношению к хлорзоксазону, полученные с помощью электрохимической и NADPH-зависимой систем.

Ферментативная система	V_{\max} , мин ⁻¹	K_M , мкМ	V_{\max}/K_M , мин ⁻¹ мкМ ⁻¹
Электрохимическая	1,64 ± 0,08	78 ± 9	0,021
NADPH-зависимая*	9,3	75	0,124

* По данным производителя бактосом.

Как видно в таблице 8, полученные значения V_{\max} и V_{\max}/K_M в электрохимической системе примерно в 5,7 и 6 раз, соответственно, меньше аналогичных параметров в NADPH-зависимой системе, что, по-видимому, может являться следствием изменений ориентации и/или конформации СУР2Е1, возникающих при иммобилизации бактосом на электроде, и менее эффективному восстановлению электронами от электрода, по сравнению с восстановлением в реконструированной системе электронами от NADPH.

Далее мы оценили влияние электрохимически восстановленной CPR на активность СУР2Е1 по отношению к хлорзоксазону. Мы предположили, что в случае переноса электронов от электрода на CPR и далее с CPR на СУР2Е1/cyt b_5 начальная скорость гидроксирования хлорзоксазона будет больше, чем начальная скорость гидроксирования хлорзоксазона при восстановлении только СУР2Е1/cyt b_5 . Для этого мы провели электрокаталитические реакции с иммобилизованными на электроде бактосомами в присутствии 280 Ед/мл каталазы и 150 мкМ хлорзоксазона при потенциалах восстановления -0,550 В (отн. Ag/AgCl) и -0,350 В (отн. Ag/AgCl). Мы установили, что при потенциале -0,350 В (отн. Ag/AgCl) происходит восстановление преимущественно СУР2Е1 и cyt b_5 . Как и ожидалось, начальная скорость образования 6-гидрокси-хлорзоксазона была больше примерно в 1,5 раза в случае проведения электрокаталитической реакции при потенциале -0,550 В (отн. Ag/AgCl), по сравнению со значением начальной скорости образования 6-гидрокси-хлорзоксазона при проведении электрокаталитической реакции при потенциале -0,350 В (отн. Ag/AgCl). Полученные результаты могут указывать на активирующую роль электрохимически восстановленной CPR по отношению к СУР2Е1, по-видимому, за счет межмолекулярного переноса электронов.

Таким образом, мы показали, что биэлектродная система может использоваться при решении задач фармакологии, связанных с определением активности СУР2Е1, а также установили влияние CPR на электрокаталитическую активность СУР2Е1.

Резюмируя результаты, полученные в данной части работы, можно сказать, что разработанная биэлектродная система может применяться для решения задач фармакологии, связанных с исследованием кинетики и ингибиторов цитохром Р450-зависимых реакций, а также для исследования механизмов ферментативного катализа в электрохимических системах.

Электрохимическая система для определения активности СУР3А4 по отношению к гидрокортизону

В данной части работы мы предложили метод определения активности СУР3А4, иммобилизованного на электроде, основанный на флуоресцентном определении 6 β -гидроксикортизола, образующегося при биотрансформации гидрокортизона.

СУР3А4 участвует в метаболизме примерно 50% всех лекарственных соединений, что обуславливает важность выявления межлекарственных взаимодействий на уровне этого фермента [Fu и соавт., 2022]. Эндогенные соединения, метаболизм которых осуществляется при участии СУР3А4, могут использоваться как маркерные субстраты при проведении ингибиторного анализа [Lee и соавт., 2021]. СУР3А4 катализирует гидроксилирование гидрокортизона с образованием 6 β -гидроксикортизола (рисунок 25).

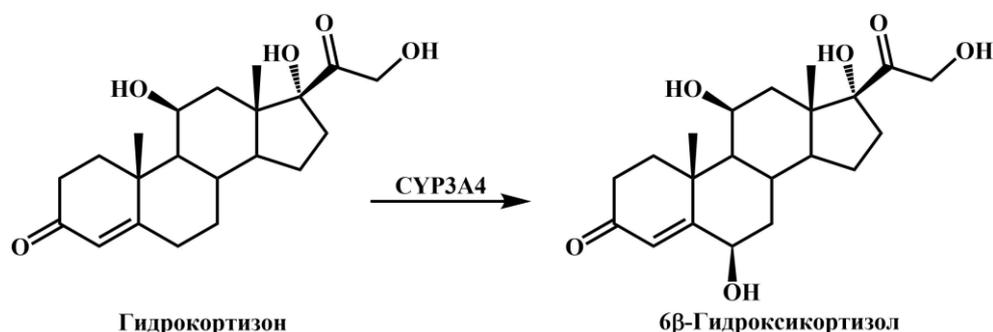


Рисунок 25. Реакция 6 β -гидроксилирования гидрокортизона при участии СУР3А4.

Хорошо известно, что обработка кортикостероидов сильными кислотами индуцирует реакции протонирования с последующим элиминированием гидроксильных групп и карбокатионные перегруппировки [Monder C., Kendall J., 1975; James и соавт., 1995], приводящие к образованию флуоресцентных производных, при этом спектры флуоресценции и интенсивность эмиссии зависят от химического строения кортикостероидов [Monder C., Kendall J., 1975]. Нами обнаружено, что после обработки гидрокортизона и 6 β -гидроксикортизола смесью серной кислоты и этанола (3:1 по объему) образуются производные этих соединений, которые при λ_{ex} 365 нм имеют различные спектры флуоресценции. При смешивании 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 100 мкМ гидрокортизон или 100 мкМ 6 β -гидроксикортизол, с двойным объемом смеси серной кислоты и этанола спектр флуоресценции раствора, содержащего гидрокортизон, характеризуется наличием пика эмиссии при λ_{em} 525 \pm 2 нм, а спектр флуоресценции

раствора, содержащего β -гидрокортизол, характеризуется наличием пика эмиссии при $\lambda_{em} 427 \pm 2$ нм (рисунок 26). Зависимость интенсивности пика эмиссии при $\lambda_{em} 427$ нм от концентрации β -гидрокортизола (от 0 до 10 мкМ) имела линейный характер (рисунки 27 А и 27 Б).

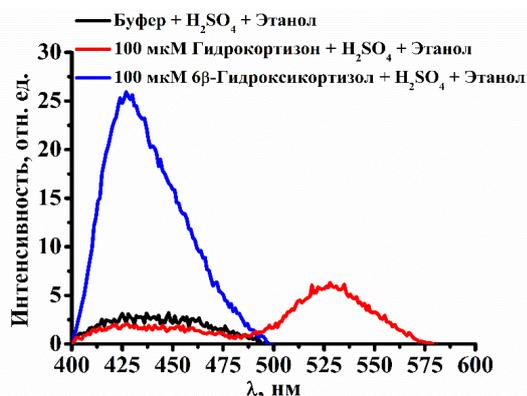


Рисунок 26. Спектры флуоресценции 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол (—) и 100 мкМ гидрокортизон (—) или 100 мкМ β -гидрокортизол (—), смешанного с двойным объемом смеси 98% серной кислоты и 96% этанола (3:1 по объему). Спектры были зарегистрированы при $\lambda_{ex} 365$ нм.

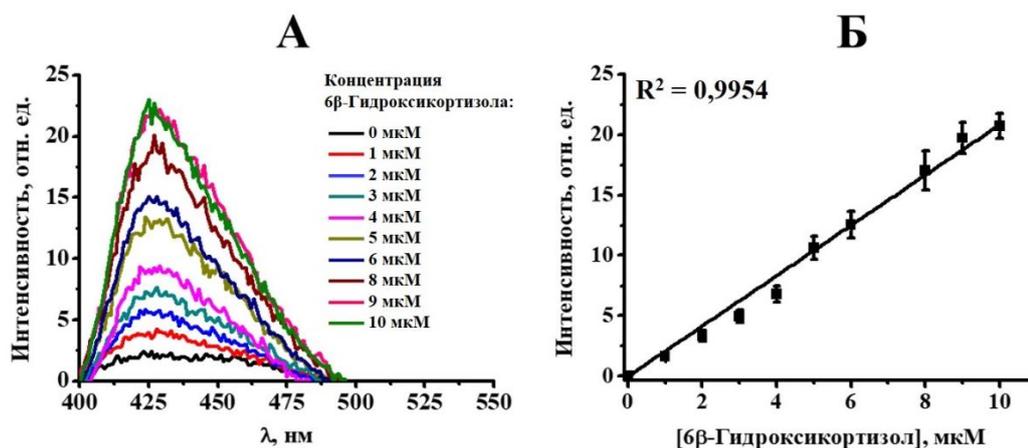


Рисунок 27. Спектры флуоресценции 100 мкМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации β -гидрокортизола (от 0 до 10 мкМ), смешанного с двойным объемом смеси серной кислоты и этанола (3:1 по объему) (А). Спектры были зарегистрированы при $\lambda_{ex} 365$ нм. Зависимость интенсивности пика эмиссии при $\lambda_{em} 427$ нм от концентрации β -гидрокортизола (Б).

Предел определяемых концентраций β -гидрокортизола данным методом был рассчитан как 320 нМ.

Мы оценили возможность определения активности СУРЗА4, иммобилизованного на ПГЭ, модифицированном ДДАБ, по отношению к гидрокортизону путем количественного флуоресцентного определения β -гидрокортизола. После проведения электрокаталитической реакции по отношению к 100 мкМ гидрокортизону в диапазоне 5-60 мин с ПГЭ, модифицированными ДДАБ и с иммобилизованным СУРЗА4, мы зарегистрировали спектр

флуоресценции полученной инкубационной смеси после дериватизации раствором серной кислоты и этанола (рисунок 28). В качестве контрольного эксперимента была проведена электрокаталитическая реакция по отношению к 100 мкМ гидрокортизону в течение 60 мин с ПГЭ, модифицированным ДДАБ, без иммобилизованного фермента с последующей регистрацией спектра флуоресценции полученной инкубационной смеси, обработанной раствором серной кислоты и этанола.

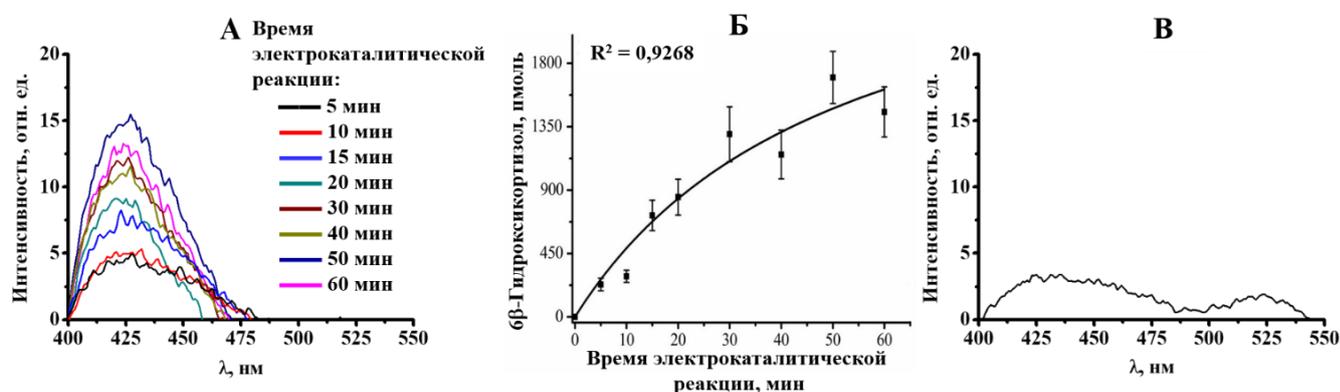


Рисунок 28. Спектры флуоресценции 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 100 мкМ гидрокортизон, смешанного с двойным объемом смеси серной кислоты и этанола (3:1 по объему), зарегистрированные после проведения электрокаталитической реакции в течение 5-60 мин при фиксированном потенциале -0,6 В (отн. Ag/AgCl) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ и с иммобилизованным СУР3А4 (**А**). Зависимость количества образующегося 6β-гидроксикортизола от времени электрокаталитической реакции (**Б**). Спектр флуоресценции буфера вышеуказанного состава, содержащего 100 мкМ гидрокортизон, смешанного с двойным объемом смеси серной кислоты и этанола (3:1 по объему), зарегистрированный после проведения электрокаталитической реакции при фиксированном потенциале -0,6 В (отн. Ag/AgCl) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ без иммобилизованного СУР3А4, в течение 60 мин (**В**). Спектры зарегистрированы при λ_{ex} 365 нм.

Как видно на рисунке 28 А, спектр флуоресценции инкубационной смеси, обработанной раствором серной кислоты и этанола после проведения СУР3А4-зависимой электрокаталитической реакции по отношению к гидрокортизону, характеризуется пиком эмиссии при λ_{em} 427 нм, что свидетельствует об образовании 6β-гидроксикортизола. Количество образующегося 6β-гидроксикортизола возрастает от времени электрокаталитической реакции (рисунок 28 Б). После проведения электрокаталитической реакции без фермента в течение 60 мин интенсивность пика эмиссии при λ_{em} 427 нм значительно меньше интенсивности пика эмиссии, регистрируемой после проведения электрокаталитической реакции в течение 60 мин с иммобилизованным на электроде СУР3А4 (рисунок 28 В).

Зависимость начальной скорости реакции гидроксирования гидрокортизона от его концентрации имела гиперболических характер (рисунок 29). Значения V_{max} , K_M и V_{max}/K_M

СУРЗА4 по отношению к гидрокортизону были определены как $89 \pm 5 \text{ мин}^{-1}$, $10 \pm 2 \text{ мкМ}$ и $8,9 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$, соответственно.

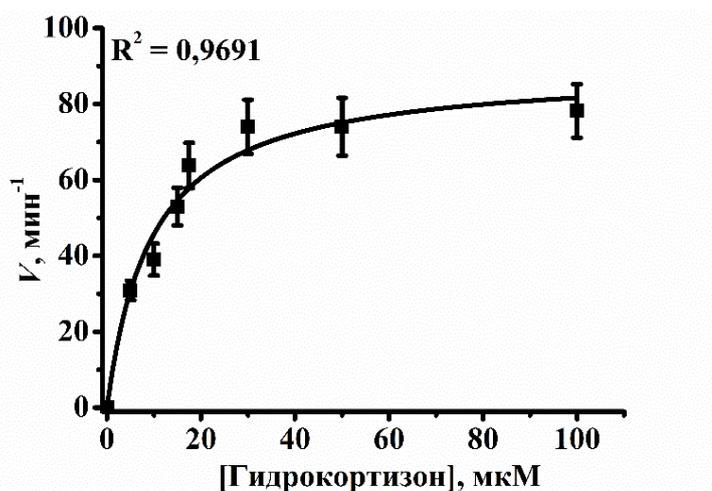


Рисунок 29. Зависимость начальной скорости СУРЗА4-зависимого образования 6β-гидроксикортизола от концентрации гидрокортизона в электрохимической системе. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов \pm стандартные отклонения.

Мы оценили возможность с помощью разработанного подхода исследовать ингибиторы СУРЗА4. В качестве ингибитора мы использовали кетоконазол. Из зависимости остаточной активности СУРЗА4 по отношению к гидрокортизону от концентрации кетоконазола (0-10000 нМ), представленной на рисунке 30, было определено значение концентрации кетоконазола, уменьшающей активность фермента на 50% (IC_{50}), составившее $70 \pm 5 \text{ нМ}$.

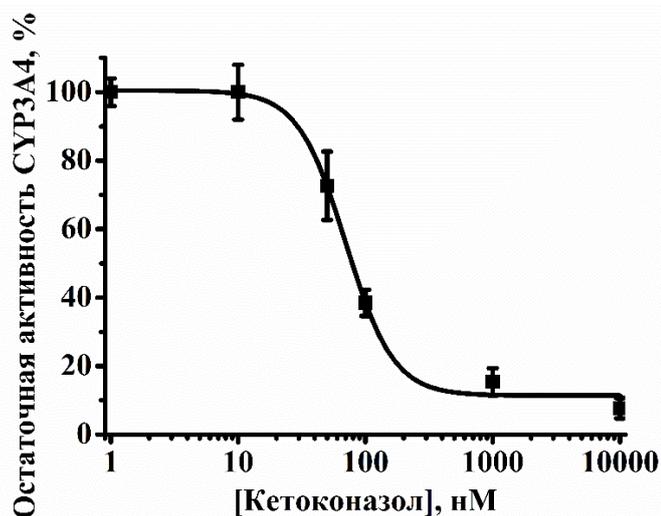


Рисунок 30. Зависимость остаточной активности СУРЗА4 по отношению к 100 мкМ гидрокортизону от концентрации кетоконазола (0-10000 нМ). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов \pm стандартные отклонения.

Таким образом, мы показали, что разработанный нами подход к определению электрокаталитической активности СУРЗА4 путем количественного определения 6β-гидроксикортизола может использоваться для выявления ингибиторов данного фермента.

ВЫВОДЫ

1. Проведено исследование электрохимических свойств андростендиона, тестостерона, (*S*)-варфарина, диклофенака, (*S*)-напроксена, фенитоина и хлорзоксазона и продуктов их соответствующих цитохром Р450-зависимых реакций: эстрогена, β -эстрадиола, (*S*)-7-гидроксиварфарина, 4'-гидроксидиклофенака, (*S*)-О-десметилнапроксена, гидроксифенитоина и 6-гидроксихлорзоксазона. Показано, что электрохимическое окисление указанных субстратов происходит при потенциалах, отличных от потенциалов электрохимического окисления соответствующих продуктов.
2. Разработана биэлектродная система, в которой один из электродов модифицирован ДДАБ и служит для иммобилизации и электрохимического восстановления рекомбинантных или мембраносвязанных цитохромов Р450, а другой электрод служит для идентификации и количественного определения образующихся эстрогена и β -эстрадиола под действием СУР19А1, (*S*)-7-гидроксиварфарина, 4'-гидроксидиклофенака и (*S*)-О-десметилнапроксена под действием СУР2С9, гидроксифенитоина под действием СУР2С19 и 6-гидроксихлорзоксазона под действием СУР2Е1 из соответствующих субстратов.
3. Кинетические профили реакций ароматизации андростендиона и тестостерона, протекающих под действием иммобилизованного на электроде СУР19А1, подчинялись кинетике Михаэлиса-Ментен. Значения V_{max} , K_M и V_{max}/K_M фермента по отношению к андростендиону были определены как $51,6 \pm 7,2 \text{ мин}^{-1}$, $4,2 \pm 1,5 \text{ мкМ}$ и $12,29 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$, а по отношению к тестостерону как $10,2 \pm 1,2 \text{ мин}^{-1}$, $3,8 \pm 1,3 \text{ мкМ}$ и $2,68 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$, соответственно.
4. Кинетические профили реакций гидроксилирования (*S*)-варфарина и диклофенака, осуществляемые под действием иммобилизованного на электроде СУР2С9, подчинялись кинетике Михаэлиса-Ментен. Значения V_{max} , K_M и V_{max}/K_M фермента по отношению к (*S*)-варфарину были определены как $0,100 \pm 0,002 \text{ мин}^{-1}$, $3,03 \pm 0,38 \text{ мкМ}$ и $0,033 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$, а к диклофенаку как $5,35 \pm 0,13 \text{ мин}^{-1}$, $11,66 \pm 0,92 \text{ мкМ}$ и $0,46 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$, соответственно. Кинетический профиль реакции О-деметилирования (*S*)-напроксена также подчинялся кинетике Михаэлиса-Ментен. Значения V_{max} , K_M и V_{max}/K_M фермента по отношению к (*S*)-напроксену были определены как $0,98 \pm 0,03 \text{ мин}^{-1}$, $331 \pm 30 \text{ мкМ}$ и $0,003 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$, соответственно.
5. Кинетический профиль реакции гидроксилирования фенитоина, протекающей под действием иммобилизованного на электроде СУР2С19, имел бифазный характер, свидетельствующий об образовании ферментом с субстратом комплексов с высокой и низкой аффинностью. Значения V_{max1} , K_{M1} , V_{max1}/K_{M1} и V_{max2}/K_{M2} СУР2С19 по отношению к фенитоину в электрохимической системе были определены как $0,094 \pm 0,002 \text{ мин}^{-1}$, $25,8 \pm 2,0 \text{ мкМ}$, $0,0036 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$ и $0,00042 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$, соответственно.

6. Кинетический профиль реакции гидроксирования хлорзоксазона, протекающей под действием иммобилизованного на электроде СУР2Е1, подчинялся кинетике Михаэлиса-Ментен. Определены параметры стационарной кинетики СУР2Е1 в составе иммобилизованных на электроде бактосом по отношению к хлорзоксазону: V_{\max} $1,64 \pm 0,08$ мин⁻¹, K_M 78 ± 9 мкМ и V_{\max}/K_M $0,021$ мин⁻¹ мкМ⁻¹. Кроме того, показана стимулирующая роль СРР в составе бактосом на электрокаталитическую активность СУР2Е1 по отношению к хлорзоксазону, по-видимому, за счет межмолекулярного переноса электронов.
7. Показано, что 6 β -гидроксикортизол, являющийся продуктом СУР3А4-зависимого гидроксирования гидрокортизона, после обработки смесью серной кислоты и этанола имеет характеристический пик флуоресценции при λ_{em} 427 ± 2 нм (при λ_{ex} 365 нм), что было использовано для разработки системы для определения гидроксилазной активности иммобилизованного на электроде СУР3А4 по отношению к гидрокортизону. Значения V_{\max} , K_M и V_{\max}/K_M были определены как 89 ± 5 мин⁻¹, 10 ± 2 мкМ и $8,9$ мин⁻¹ мкМ⁻¹, соответственно.
8. На примере ингибирования СУР19А1 экзестаном, СУР2С9 сульфафеназолом, СУР2С19 флуконазолом и СУР3А4 кетоконазолом показана возможность применения разработанных систем для исследования ингибиторов указанных цитохромов Р450.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных журналах:

1. Кузиков А.В. Методы определения функциональной активности изоферментов цитохрома Р450 / А.В. Кузиков, Р.А. Масамрех, А.И. Арчаков, В.В. Шумянцева // Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64. – № 2. – С. 149-168.
- 1a. Kuzikov A.V. Methods for determining of cytochrome P450 isozymes functional activity / A.V. Kuzikov, R.A. Masamrekh, A.I. Archakov, V.V. Shumyantseva // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2018. – V. 12. – P. 220-240.
2. Masamrekh R. Interaction of 17 α -hydroxylase, 17 (20)-lyase (CYP17A1) inhibitors – abiraterone and galeterone – with human sterol 14 α -demethylase (CYP51A1) / R. Masamrekh, A. Kuzikov, A. Veselovsky, I. Toropygin, T. Shkel, N. Strushkevich, A. Gilep, A. Usanov, A. Archakov, V. Shumyantseva // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2018. – V. 186. – P. 24-33.
3. Кузиков А.В. Новый метод количественного определения стероидных метаболитов цитохром Р450-зависимых реакций с использованием флуоресцентной спектроскопии / А.В. Кузиков, Р.А. Масамрех, В.В. Шумянцева, А.И. Арчаков // Доклады Академии наук, - 2018. – Т. 483. – № 1. – С. 103-106.

- 3a. Kuzikov A.V. A new method for quantitative determination of steroid metabolites of cytochrome P450-dependent reactions using fluorescent spectroscopy / A.V. Kuzikov, R.A. Masamrekh, V.V. Shumyantseva, A.I. Archakov // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2018. – V. 483. – № 1. – P. 302-305.
4. Shumyantseva V.V. From electrochemistry to enzyme kinetics of cytochrome P450 / V.V. Shumyantseva, A.V. Kuzikov, R.A. Masamrekh, T.V. Bulko, A.I. Archakov // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2018. – V. 121. – P. 192-204.
5. Kuzikov A. Assessment of electrocatalytic hydroxylase activity of cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) by means of derivatization of 6 β -hydroxycortisol by sulfuric acid for fluorimetric assay / A. Kuzikov, R. Masamrekh, T. Shkel, N. Strushkevich, A. Gilep, S. Usanov, A. Archakov, V. Shumyantseva // *Talanta*. – 2019. – V. 196. – P. 231-236.
6. Masamrekh R.A. In vitro interactions of abiraterone, erythromycin, and CYP3A4: implications for drug–drug interactions / R.A. Masamrekh, A.V. Kuzikov, Y.I. Haurychenka, K.A. Shcherbakov, A.V. Veselovsky, D.A. Filimonov, A.V. Dmitriev, M.G. Zavialova, A.A. Gilep, T.V. Shkel, N.V. Strushkevich, S.A. Usanov, A.I. Archakov, V.V. Shumyantseva // *Fundamental & clinical pharmacology*. – 2020. – V. 34. – № 1. – P. 120-130.
7. Kuzikov A. Interaction of isatin with cytochrome P450 isoenzymes: investigation by means of spectral and electrochemical methods. The role of isatin in cytochromes P450 ligand-protein binding events / A. Kuzikov, R. Masamrekh, P. Ershov, Y. Mezentsev, A. Ivanov, A. Gilep, S. Usanov, V. Shumyantseva // *BioNanoScience*. – 2020. – V. 10. – P. 157-167.
8. Kuzikov A.V. Electrochemical oxidation of estrogens as a method for CYP19A1 (aromatase) electrocatalytic activity determination / A.V. Kuzikov, R.A. Masamrekh, T.A. Filippova, Ya.I. Haurychenka, A.A. Gilep, T.V. Shkel, N.V. Strushkevich, S.A. Usanov, V.V. Shumyantseva // *Electrochimica Acta*. – 2020. – V. 333. – P. 135539.
9. Кузиков А.В. Цитохром P450 3A4 как фермент биотрансформации лекарств: роль модификаций сенсорных систем в электрокатализе и электроанализе / А.В. Кузиков, Т.В. Булко, П.И. Королева, Р.А. Масамрех, С.С. Бабкина, А.А. Гилеп, В.В. Шумянцева // *Биомедицинская химия*. – 2020. – Т. 66. – № 1. – С. 64-70.
- 9a. Kuzikov A.V. Cytochrome P450 3A4 as a drug metabolizing enzyme: The role of sensor system modifications in electrocatalysis and electroanalysis / A.V. Kuzikov, T.V. Bulko, P.I. Koroleva, R.A. Masamrekh, S.S. Babkina, A.A. Gilep, V.V. Shumyantseva // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. – 2020. – V. 14. – P. 252-259.
10. Shumyantseva V.V. All-electrochemical nanocomposite two-electrode setup for quantification of drugs and study of their electrocatalytic conversion by cytochromes P450 / V.V. Shumyantseva, T.V. Bulko, A.V. Kuzikov, R.A. Masamrekh, A.Yu. Konyakhina, Iu. Romanenko, J.B. Max, M. Köhler, A.A. Gilep, S.A. Usanov, D.V. Pergushov, F.H. Schacher, L.V. Sigolaeva // *Electrochimica Acta*. – 2020. – V. 336. – P. 135579.

11. Королева П.И. Моделирование межлекарственного взаимодействия омепразола и эритромицина с использованием цитохром Р450-зависимой системы *in vitro* / П.И. Королева, А.В. Кузиков, Р.А. Масамрех, Д.А. Филимонов, А.В. Дмитриев, М.Г. Завьялова, С.М. Рыкова, Е.В. Ших, А.А. Махова, Т.В. Булко, А.А. Гилеп, В.В. Шумянцева // Биомедицинская химия. – 2020. – Т. 66. – №. 3. – С. 241-249.
- 11a. Koroleva P.I. Modeling of drug-drug interactions between omeprazole and erythromycin with cytochrome P450 3A4 *in vitro* assay / P.I. Koroleva, A.V. Kuzikov, R.A. Masamrekh, D.A. Filimonov, A.V. Dmitriev, M.G. Zaviyalova, S.M. Rikova, E.V. Shich, A.A. Makhova, T.V. Bulko, A.A. Gilep, V. V. Shumyantseva // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2021. – V. 15. – P. 62-70.
12. Kuzikov A.V. Electrochemical determination of (*S*)-7-hydroxywarfarin for analysis of CYP2C9 catalytic activity / A.V. Kuzikov, T.A. Filippova, R.A. Masamrekh, V.V. Shumyantseva // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2022. – V. 904. – P. 115937.
13. Агафонова Л.Е. Сенсоры для анализа лекарственных препаратов, межлекарственных взаимодействий и каталитической активности ферментов / Л.Е. Агафонова, Т.В. Булко, А.В. Кузиков, Р.А. Масамрех, В.В. Шумянцева // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2022. – № 1. – С. 43-49.
- 13a. Agafonova L.E. Sensors for analysis of drugs, drug-drug interactions, and catalytic activity of enzymes / L.E. Agafonova, T.V. Bulko, A.V. Kuzikov, R.A. Masamrekh, V.V. Shumyantseva // Bulletin of Russian State Medical University. – 2022. – №. 1. – P. 41-46.
14. Kuzikov A.V. Electroanalysis of 4'-hydroxydiclofenac for CYP2C9 enzymatic assay / A.V. Kuzikov, T.A. Filippova, R.A. Masamrekh, V.V. Shumyantseva // Electrocatalysis. – 2022. – V. 13. – № 5. – P. 630-640.
15. Масамрех Р.А. Взаимодействие абиратерона и его фармакологически активного метаболита D4A с цитохромом Р450 2C9 (CYP2C9) / Р.А. Масамрех, А.В. Кузиков, Т.А. Филиппова, К.А. Щербakov, А.В. Веселовский, В.В. Шумянцева // Биомедицинская химия. – 2022. – Т. 68. – № 3. – С. 201-211.
- 15a. Masamrekh R.A. Interaction of abiraterone and its pharmacologically active metabolite D4A with cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) / R.A. Masamrekh, A.V. Kuzikov, T.A. Filippova, K.A. Sherbakov, A.V. Veselovsky, V.V. Shumyantseva // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2022. – V. 16. – №. 4. – P. 328-339.
16. Kuzikov A.V. Biotransformation of phenytoin in the electrochemically-driven CYP2C19 system / A.V. Kuzikov, T.A. Filippova, R.A. Masamrekh, V.V. Shumyantseva // Biophysical Chemistry. – 2022. – V. 291. – P. 106894.
17. Shumyantseva V.V. Enzymology on an electrode and in a nanopore: Analysis algorithms, enzyme kinetics, and perspectives / V.V. Shumyantseva, A.V. Kuzikov, R.A. Masamrekh, T.A. Filippova, P.I. Koroleva, L.E. Agafonova, T.V. Buklo, A.I. Archakov // BioNanoScience. – 2022. – V. 12. – №. 4. – P. 1341-1355.

18. Kuzikov A.V. Electrochemical analysis of metabolites as a method for cytochromes P450 activity determination / A.V. Kuzikov, R.A. Masamrekh, T.A. Filippova, V.V. Shumyantseva // *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. – 2022. – V. 5. – № 4. – P. e00176-e00176.
19. Filippova T.A. Voltammetric analysis of (S)-O-desmethylnaproxen for determination of CYP2C9 demethylase activity / T.A. Filippova, R.A. Masamrekh, V.V. Shumyantseva, Y.Y. Khudoklinova, A.V. Kuzikov // *BioNanoScience*. – 2023. – V. 13. – № 3. – P. 1278-1288.
20. Kuzikov A.V. Bielectrode strategy for determination of CYP2E1 catalytic activity: electrodes with bacosomes and voltammetric determination of 6-hydroxychlorzoxazone / A.V. Kuzikov, R.A. Masamrekh, T.A. Filippova, A.M. Tumilovich, N.V. Strushkevich, A.A. Gilep, Y.Y. Khudoklinova, V.V. Shumyantseva // *Biomedicines*. – 2024. – V. 12. – № 1. – P. 152.
21. Koroleva P.I. / Electrochemical Assessment of CYP3A4 Catalytic Activity in Bacosomes / P.I. Koroleva, A.V. Kuzikov, A.A. Gilep, T.V. Bulko, V.V. Shumyantseva // *BioNanoScience*. – 2024. – V. 14. – № 3. – P. 2930-2939.

Материалы трудов конференций:

22. Кузиков А.В. Взаимодействие противоопухолевых соединений – ингибиторов CYP17A1 – со стероид-метаболизирующими изоферментами цитохрома P450 / Р.А. Масамрех, А.С. Латышева, М.С. Завьялова, А.В. Кузиков // Сборник тезисов докладов V Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии». – Судак-Крым, 2019. – С. 49.
23. Кузиков А.В. Электрохимическая система на основе CYP19A1 (ароматазы) для скрининга противоопухолевых препаратов / Т.А. Филиппова, Я.И. Гавриченко, Р.А. Масамрех, А.В. Кузиков // Сборник тезисов 24-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2020. – С. 109.
24. Кузиков А.В. Электрохимическая система на основе CYP19A1 (ароматазы) для исследования ингибиторной активности противоопухолевых соединений / А.В. Кузиков, Р.А. Масамрех, Т.А. Филиппова, Я.И. Гавриченко, В.В. Шумянцева // Сборник тезисов X Юбилейной Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2020». – Казань, 2020. – С. 41-42.
25. Кузиков А.В. Цитохром P450-электрокаталитические системы как модели в поиске новых лекарственных препаратов, исследовании метаболизма и анализе межлекарственных взаимодействий / В.В. Шумянцева, Т.В. Булко, Р.А. Масамрех, П.И. Королева, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Сборник тезисов X Юбилейной Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2020». – Казань, 2020. – С. 26-27.
26. Кузиков А.В. Электрохимические системы для анализа активности клинически значимых цитохромов P450 / Т.А. Филиппова, Р.А. Масамрех, В.В. Шумянцева, А.В. Кузиков // Сборник тезисов

докладов VII Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии». – М., 2021. – С. 60.

27. Кузиков А.В. Электрохимическая система для определения активности ароматазы / А.В. Кузиков, Т.А. Филиппова, Р.А. Масамрех, В.В. Шумянцева // Тезисы докладов VII Съезда биохимиков России, X Российского симпозиума «Белки и пептиды» и VII Съезда физиологов СНГ в рамках III Объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. – Сочи-Дагомыс, 2021. – Т. 2. – С. 126.

28. Кузиков А.В. Электрохимический анализ продуктов цитохром Р450-зависимого метаболизма лекарственных препаратов / А.В. Кузиков, Т.А. Филиппова, Р.А. Масамрех, В.В. Шумянцева // Тезисы докладов на IV Съезде аналитиков России. – М., 2022. – С. 27.

29. Кузиков А.В. Электрохимические системы для исследования цитохром Р450-зависимого метаболизма лекарственных препаратов: современное состояние и перспективы / А.В. Кузиков, Р.А. Масамрех, Т.А. Филиппова, В.В. Шумянцева // Сборник трудов XXIV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера, посвященной 85-летию со дня рождения профессора А.В. Кравцова. – Томск, 2023. – Т. 1. – С. 362.

Список сокращений и обозначений

ДДАБ – дидодецилдиметиламмония бромид; Отн. – относительно; Отн. ед. – относительные единицы; ОУНТ – одностенные углеродные нанотрубки; ПГЭ – печатный графитовый электрод; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; CHAPS – 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]пропан-1-сульфонат; CPR – цитохром Р450 редуктаза; CYP – цитохром Р450; CYP2C9 – цитохром Р450 2С9; CYP2E1 – цитохром Р450 2Е1; CYP3A4 – цитохром Р450 3А4; $cyt\ b_5$ – цитохром b_5 ; F – постоянная Фарадея; IC_{50} – концентрация ингибитора, при которой активность фермента уменьшается на 50%; k_{cat} – константа каталитическая; K_i – константа ингибирования; K_I – концентрация ингибитора, необходимая для инактивации фермента на 50%; k_{inact} – максимальное значение константы скорости инактивации фермента; K_M – константа Михаэлиса; K_{M1} – константа Михаэлиса для высокоаффинной формы фермента; K_{M2} – константа Михаэлиса для низкоаффинной формы фермента; k_{obs} – наблюдаемая константа скорости инактивации фермента при определенной концентрации ингибитора; \ln – натуральный логарифм; n – число электронов, участвующих в электрохимической реакции; NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный; Q – заряд; R^2 – коэффициент детерминации; $t_{1/2}$ – время полуинактивации; V – начальная скорость реакции; V_{max} – максимальная скорость реакции; V_{max}/K_M – эффективность катализа; V_{max1} – максимальная скорость реакции для высокоаффинной формы фермента; V_{max2} – максимальная скорость реакции для низкоаффинной формы фермента; λ_{em} – длина волны пика эмиссии; λ_{ex} – длина волны возбуждения; $[S]$ – концентрация субстрата.