

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

На правах рукописи

Кузиков Алексей Владимирович

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

1.5.4. – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор
Шумянцева Виктория Васильевна

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Значимость цитохромов P450 в живых системах	14
1.2. Особенности структурно-функциональной организации основных цитохром P450-содержащих систем.....	15
1.3. Методология определения активности цитохромов P450	18
1.4. Электрохимические системы на основе цитохромов P450: механизмы электрокаталитических реакций и определение активности.....	21
1.4.1. Теоретические аспекты функционирования электрохимических систем на основе цитохромов P450.....	23
1.4.2. Электрохимические системы на основе очищенных цитохромов P450 ...	32
1.4.2.1. Адсорбция цитохромов P450 на немодифицированных электродах.....	32
1.4.2.2. Иммобилизация цитохромов на электродах P450 с помощью тонких пленок	33
1.4.2.3. Иммобилизация цитохромов P450 с помощью метода послойного нанесения белка и полимерных пленок	35
1.4.2.4. Инкапсулирование цитохромов P450 с помощью гелей.....	39
1.4.2.5. Ковалентная иммобилизация цитохромов P450 на поверхности электродов.....	40
1.4.2.6. Иммобилизация цитохромов P450 на поверхности электродов с помощью композитных материалов.....	44
1.4.3. Электрохимические системы на основе полусинтетических флавоцитохромов P450 и химерных цитохромов P450.....	47
1.4.4. Электрохимические системы на основе мембраносвязанных цитохромов P450	51
1.4.4.1. Адсорбция мембраносвязанных цитохромов P450 на немодифицированных электродах.....	52
1.4.4.2. Иммобилизация мембраносвязанных цитохромов P450 на электродах с помощью тонких пленок.....	54

1.4.4.3. Иммобилизация мембраносвязанных цитохромов P450 с помощью метода послойного нанесения.....	58
1.4.4.4. Инкапсулирование мембраносвязанных цитохромов P450 с помощью гелей.....	60
1.4.4.5. Иммобилизация мембраносвязанных цитохромов P450 за счет электростатического взаимодействия с функционализированными поверхностями электродов.....	61
1.4.4.6. Адсорбция на электродах, модифицированных углеродными нанотрубками.....	64
1.5. Концепция биэлектродных электрохимических систем для определения активности ферментов	67
1.6. Электрохимическое определение метаболитов лекарственных соединений.....	70
1.6.1. Электрохимическое определение продуктов реакций ароматического гидроксилирования	71
1.6.2. Электрохимическое определение продуктов реакций О-деалкилирования	78
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	83
2.1. Реактивы.....	83
2.2. Препараты ферментов.....	84
2.3. Электроды	85
2.4. Оборудование	86
2.5. Методики исследования	87
2.5.1. Химическая модификация электродов и иммобилизация цитохромов P450, cyt <i>b</i> ₅ , CPR или бактосом.....	87
2.5.2. Исследование электрохимических свойств цитохромов P450, cyt <i>b</i> ₅ , CPR и бактосом в анаэробных условиях	87
2.5.3. Электрохимическое определение субстратов и метаболитов цитохром P450-зависимых реакций.....	89

2.5.3.1. Электрохимическое определение андростендиона, тестостерона, эстрона и β -эстрадиола	89
2.5.3.2. Электрохимическое определение (S)-варфарина и (S)-7-гидроксиварфарина	90
2.5.3.3. Электрохимическое определение диклофенака и 4'-гидроксидиклофенака	90
2.5.3.4. Электрохимическое определение (S)-напроксена и (S)-О-десметилнапроксена.....	91
2.5.3.5. Электрохимическое определение фенитоина и 4-гидроксифенитоина..	92
2.5.3.6. Электрохимическое определение хлорзоксазона и 6-гидроксихлорзоксазона.....	93
2.5.4. Определение гидрокортизона и 6 β -гидроксикортизола методом флуоресцентной спектроскопии	93
2.5.5. Определение электрокаталитической активности цитохромов P450	94
2.5.5.1. Определение электрокаталитической активности CYP19A1	94
2.5.5.2. Определение электрокаталитической активности CYP2C9 по отношению к (S)-варфарину.....	96
2.5.5.3. Определение электрокаталитической активности CYP2C9 по отношению к диклофенаку.....	96
2.5.5.4. Определение электрокаталитической активности CYP2C9 по отношению к (S)-напроксену	97
2.5.5.5. Определение электрокаталитической активности CYP2C19 по отношению к фенитоину	98
2.5.5.6. Определение электрокаталитической активности CYP2E1-содержащих бактосом по отношению к хлорзоксазону.....	98
2.5.5.7. Определение электрокаталитической активности CYP3A4 по отношению к гидрокортизону.....	100
2.5.6. Определение параметров стационарной кинетики биотрансформации исследуемых соединений при участии цитохромов P450	101
2.5.7. Математическая и статистическая обработка данных	102

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	103
3.1. Разработка методологии биэлектродной электрохимической системы для определения активности цитохромов P450	103
3.1.1. Биэлектродная электрохимическая система для определения каталитической активности CYP19A1 по отношению к андрогенам.....	103
3.1.2. Биэлектродная электрохимическая система для определения каталитической активности CYP2C9 по отношению к (S)-варфарину	120
3.1.3. Биэлектродная электрохимическая система для определения каталитической активности CYP2C9 по отношению к диклофенаку	132
3.1.4. Биэлектродная электрохимическая система для определения каталитической активности CYP2C9 по отношению к (S)-напроксену	147
3.1.5. Электрохимическая система для определения каталитической активности CYP2C19 по отношению к фенитоину	157
3.1.6. Биэлектродная электрохимическая система для определения каталитической активности CYP2E1 по отношению к хлорзоксазону	168
3.2. Методы определения метаболитов электрокаталитических цитохром P450-зависимых реакций, основанные на флуоресцентной спектроскопии: электрохимическая система для определения активности CYP3A4 по отношению к гидрокортизону.....	201
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	212
ВЫВОДЫ	218
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	221
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	227
ПРИЛОЖЕНИЕ	269
БЛАГОДАРНОСТИ	274

ВВЕДЕНИЕ

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 [1]. 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 [2-5]. 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 [6]. 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}) [1], 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 [2, 7, 8]. Для этих целей при использовании электрохимических систем для определения активности цитохромов Р450 необходимо дополнительно применять трудоемкие

хроматографические и масс-спектрометрические методы [6, 9], что ограничивает проведение высокопроизводительных исследований функциональной активности цитохромов P450 в экспериментальной фармакологии [10]. Таким образом, актуальной является разработка новых высокопроизводительных и удобных в практическом применении электрохимических систем для идентификации и количественного определения метаболитов, образующихся при протекании цитохром P450-зависимых каталитических реакций.

Решение проблемы, связанной с точным определением параметров стационарной кинетики цитохромов P450, может быть достигнуто в случае использования биэлектродной системы, в которой один из электродов служит для иммобилизации цитохромов P450 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 многоступенчатых 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 CYP3A4, иммобилизованного на электроде, по отношению к гидрокортизону, основанную на регистрации продукта реакции – 6 β -гидрокортизола – 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 Р450-зависимых реакций, основанные на применении электрохимических и флуоресцентных методов. Автором диссертационной работы показана возможность применения разработанных подходов для исследования кинетики цитохромов Р450 19А1 (СYP19А1), 2С9 (СYP2С9), 2С19 (СYP2С19), 2Е1 (СYP2Е1) и 3А4 (СYP3А4). 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 Р450-зависимых реакций. Исследованы электрохимические свойства ряда метаболитов лекарственных или эндогенных соединений, образующихся при участии клинически значимых цитохромов Р450 19А1, 2С9, 2С19, 2Е1. 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 СYP19А1, СYP2С9, СYP2С19, СYP2Е1 и их метаболитов, была разработана оригинальная электрохимическая система для определения активности цитохромов Р450, 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 CYP3A4 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 CYP3A4, обработанных серной кислотой. На основании этого был разработан подход к определению активности CYP3A4, 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.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Продукты цитохром P450-зависимых реакций ароматического гидроксилирования, 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 результатов.

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 Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Россия, Пущино, 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 результатам диссертационной работы опубликовано 29 работ, в том числе 21 статья в рецензируемых научных изданиях и 8 работ в сборниках трудов научных конференций.

Работа выполнена в лаборатории биоэлектрохимии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) совместно с кафедрой биохимии медико-биологического факультета и лабораторией биокаталитических систем Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России) 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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Значимость цитохромов P450 в живых системах

Цитохромы P450 – гем-тиолатные монооксигеназы, катализирующие реакции гидроксилирования алифатических и ароматических соединений, окисления спиртов и аминов, окисления гетероатомов (N, S, P и I), эпоксилирования алкенов и аренов, дегалогенирования, деаминирования и N-, O- и S-деалкилирования [11]. Ферменты суперсемейства цитохрома P450 обнаружены у представителей всех царств [12]. У человека цитохромы P450 локализованы в эндоплазматическом ретикулуме и митохондриях практически всех тканей. Большое число лекарственных соединений подвергается метаболизму при участии цитохромов P450 печени, при этом изменение метаболизма лекарственных препаратов за счет генетических особенностей этих ферментов или возникновение межлекарственных взаимодействий при одновременном использовании нескольких препаратов может являться причиной возникновения нежелательных побочных эффектов [13]. Цитохромы P450, участвующие в метаболизме эндогенных соединений, рассматриваются как молекулярные мишени для лечения ряда заболеваний. Так, например, цитохром P450 17A1 (CYP17A1) и CYP19A1 (ароматаза), продуцирующиеся в стероидогенных тканях, катализируют ключевые стадии биосинтеза андрогенов и эстрогенов, соответственно, что делает эти ферменты молекулярными мишенями для действия лекарственных соединений, ингибирующих их активность, при лечении гормон-зависимых опухолей [14, 15]. Цитохром P450 11A1 (CYP11A1), катализирующий образование прегненолона из холестерина, также рассматривается в качестве перспективной мишени для лечения гормон-зависимых опухолей [16]. Кроме того, цитохром P450 11B1 (CYP11B1), локализованный в коре надпочечников, является перспективной молекулярной мишенью для лечения болезни Кушинга [17], а цитохром P450 11B2 (CYP11B2, альдостерон синтаза), также локализованный в коре надпочечников, – для лечения гипертонии [18, 19].

Цитохром P450 5A1 (CYP5A1, тромбоксан синтаза), локализованный в гемопоэтических клетках и многих других тканях и участвующий в биосинтезе мощного индуктора вазоконстрикции и агрегации тромбоцитов тромбксана A2, является молекулярной мишенью для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [20].

Цитохромы P450 патогенных микроорганизмов также представляют фармакологический интерес для разработки препаратов, ингибирующих их активность [21-23]. Ингибиторы цитохромов P450, участвующих в различных стадиях метаболизма арахидоновой кислоты, рассматриваются в качестве молекулярных мишеней для действия препаратов, направленных на лечение сердечно-сосудистых и опухолевых заболеваний [24]. Биотехнологический интерес к цитохромам P450 обусловлен их способностью осуществлять реакции с высокой регио- и стереоселективностью [25].

Применение эффективных подходов к определению активности этих ферментов является важной составляющей фармакокинетического анализа при разработке новых лекарственных препаратов и выявлении возможных межлекарственных взаимодействий. Исследование ингибиторных свойств по отношению к изоферментам цитохрома P450 новых соединений, перспективных для дальнейших исследований в качестве лекарственных препаратов, является критически важной задачей при разработке фармацевтических препаратов [26].

1.2. Особенности структурно-функциональной организации основных цитохром P450-содержащих систем

Каталитическая активность цитохромов P450 зависит от переноса электронов к иону железа гема этих ферментов при участии редокс-партнерных белков. В зависимости от молекулярной организации электрон-транспортной цепи, цитохром P450-содержащие системы можно разделить на несколько классов, из которых I класс электрон-транспортной цепи существует у прокариот и в митохондриальной мембране эукариот, а II класс локализован у эукариот в мембране

эндоплазматического ретикулума [25, 27]. В электрон-транспортной цепи I класса электроны от NADPH переносятся на FAD-содержащий белок ферредоксин (адренодоксин) редуктазу и далее на FeS-содержащий белок ферредоксин (адренодоксин), который восстанавливает ион железа гема цитохрома P450. В митохондриях млекопитающих цитохромы P450 осуществляют ряд важнейших стадий биосинтеза стероидных гормонов [27, 28]. Другие цитохром P450-содержащие митохондриальные системы участвуют в отдельных стадиях метаболизма холестерина [28]. В электрон-транспортной цепи II класса электроны от NADPH последовательно восстанавливают FAD и FMN, входящие в состав флавопротеина – цитохром P450 редуктазы (CPR), которая восстанавливает цитохром P450 [29]. Для функционирования ряда цитохромов P450 необходимым компонентом также является гемопrotein цитохром b_5 (cyt b_5) [30-33].

Белок-белковые и белок-липидные взаимодействия играют важнейшую роль в функционировании микросомальных монооксигеназных систем [34]. Липиды мембран модулируют каталитическую активность цитохромов P450, влияя на конформацию ферментов и, соответственно, на их взаимодействие с редокс-партнерными белками и субстратами [35-37].

Каталитический цикл цитохрома P450, представленный на рисунке 1, является общепринятым [3, 38-43]. В отсутствие субстрата или ингибитора ион железа гема цитохрома P450 связан с шестым лигандом – молекулой воды. На первой стадии каталитического цикла происходит взаимодействие субстрата с активным центром фермента, ион железа гема которого находится в низкоспиновой ферри-форме (стадия 1 на рисунке 1). Связывание субстрата индуцирует смещение иона железа гема из плоскости порфиринового кольца в направлении пятого лиганда, т.е. атома серы остатка цистеина, при этом происходит вытеснение молекулы воды и переход иона железа гема в высокоспиновое состояние. В результате этих процессов происходит смещение редокс-потенциала иона железа в более положительную область, что способствует его восстановлению электроном, поставляемым CPR (или другим редокс-партнерным белком) (стадия 2 на рисунке 1). В результате восстановления иона железа гема первым электроном происходит

образование комплекса ферро-формы фермента с субстратом. Ион железа гема цитохрома P450 в восстановленном состоянии эффективно связывает кислород (стадия 3 на рисунке 1), при этом образующаяся ферро-окси-форма фермента находится в равновесии с ферри-суперокси-формой, содержащей неспаренный электрон на дистальном атоме кислорода. Комплекс ферри-суперокси-формы фермента с субстратом может распадаться до супероксидного аниона (O_2^-) и окисленной формы цитохрома P450. При протекании продуктивного каталитического процесса комплекс ферри-суперокси-формы цитохрома P450 с субстратом восстанавливается вторым электроном, поставляемым CPR (или другим редокс-партнерным белком, в том числе $cyt\ b_5$ для некоторых изоферментов цитохрома P450), что приводит к образованию ферри-перокси-формы фермента (стадия 4 на рисунке 1). Дальнейшее протонирование ферри-перокси-формы цитохрома P450 приводит к образованию ферри-пергидрокси-формы фермента (стадия 5 на рисунке 1), распад которой является следствием образования пероксида водорода (H_2O_2) и окисленной формы цитохрома P450. При протекании продуктивного каталитического процесса ферри-пергидрокси-форма протонируется, что приводит к отщеплению воды и формированию оксо-феррильной-формы цитохрома P450 (стадия 6 на рисунке 1), непосредственно участвующей в окислении субстрата (стадия 7 на рисунке 1). Заключительной стадией цикла является высвобождение продукта реакции (стадия 8 на рисунке 1).

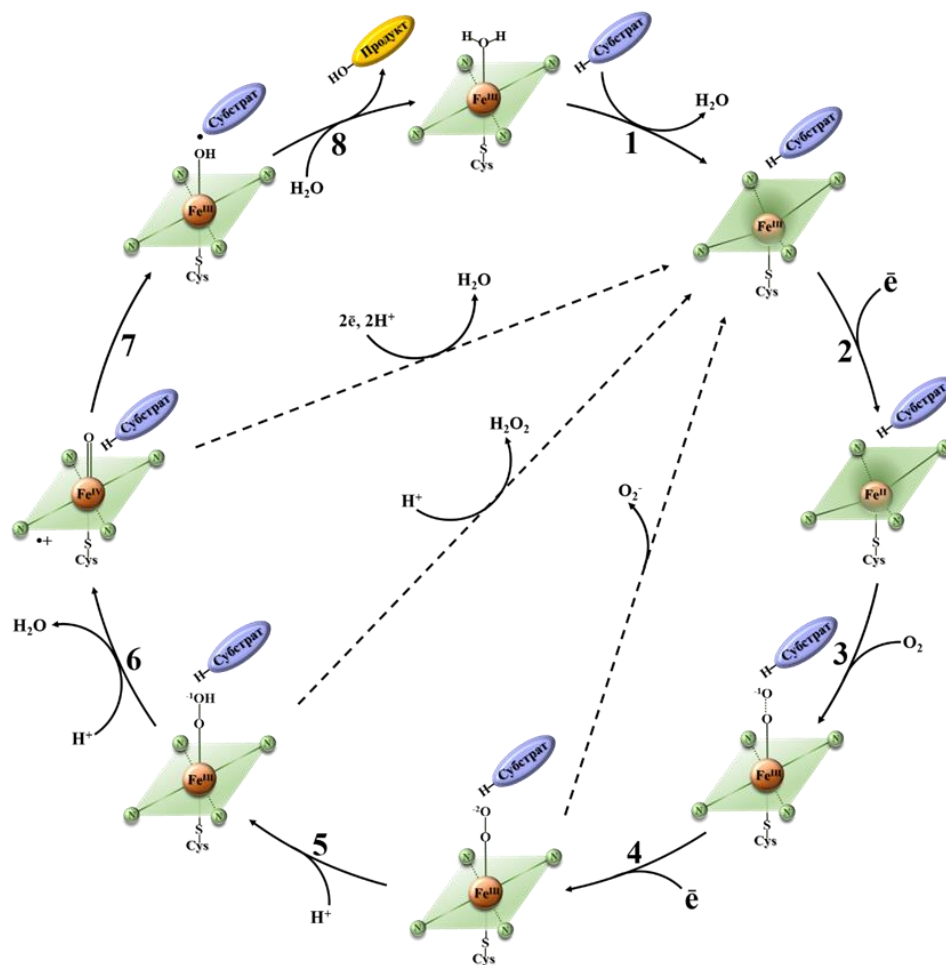


Рисунок 1. Каталитический цикл цитохрома Р450. Пояснение в тексте.

1.3. Методология определения активности цитохромов Р450

Цитохромы Р450 осуществляют биотрансформацию большого количества различных химических соединений, что обуславливает необходимость подбора оптимальных в каждом конкретном случае методов идентификации и количественного определения продуктов каталитических реакций. На сегодняшний день разработано большое количество подходов для определения каталитической активности цитохромов Р450, основанных на мониторинге образования продуктов реакций методами хромато-масс-спектрометрического или спектрального анализа [44, 45]. Такие подходы, несмотря на их распространенность, являются многоэтапными, трудоемкими, требующими проведения дополнительных стадий удаления из образцов белков и других

молекул, затрудняющих проведение хроматографии, а также больших количеств фермента, что необходимо для достижения образования достаточных для определения концентраций продуктов реакций (выше предела определяемых концентраций) [45, 46]. Кроме того, не все соединения возможно эффективно анализировать методом масс-спектрометрии. Так, применение широко используемого метода электроспрейной ионизации может быть затруднено при определении слабо ионизируемых соединений, в числе которых нейтральные, неполярные молекулы [47]. В этом случае часто прибегают к методам химической дериватизации исследуемых соединений [47, 48].

Методы, основанные на использовании абсорбционной и флуоресцентной спектроскопий для идентификации и количественного определения метаболитов, часто применяются для исследования каталитической активности цитохромов P450. В результате реакций O- или N-деалкилирования ряда субстратов в качестве одного из продуктов образуется формальдегид, дающий по реакции Ганча (Hantzsch) в присутствии уксуснокислого аммония окрашенное соединение с ацетилацетоном – 3,5-диацетил-1,4-дегидро-2,6-пиридин – с максимумом поглощения при 412 нм, что лежит в основе его количественного колориметрического определения [49-51]. Данный подход часто применяется для определения O- или N-деметиلاзной активности цитохромов P450. Кроме того, было показано, что изокапроальдегид, образующийся в результате реакции превращения холестерина в прегненолон, катализируемой CYP11A1, также образует окрашенный комплекс по реакции Ганча, что может лежать в основе метода определения активности CYP11A1 [52]. Сравнительно большей чувствительностью обладают методы, основанные на флуоресцентной спектроскопии. Флуоресцентный анализ является высокочувствительным и широко используется в биохимии, в том числе при проведении скрининга различных химических соединений с целью выявления ингибиторов клинически значимых цитохромов P450 [45, 53-56]. В качестве синтетических флуорогенных субстратов цитохромов P450 используются производные резорфина [57], 6-гидроксихинолина, флуоресцеина [58], 7-гидроксикумарина [59-61]. За счет

способности ряда флуорогенных субстратов проходить через клеточные мембраны они могут использоваться не только для определения активности цитохромов P450 в реконструированных или микросомальных системах, но и для определения активности ферментов непосредственно в клетках [62].

Предприняты попытки использования методов определения каталитической активности цитохромов P450 по поглощению в процессе реакций NADPH, кислорода, пероксида водорода, органических гидропероксидов или по образованию активных форм кислорода (АФК) [44], однако эти методы не получили широкого распространения.

В доклинических и клинических исследованиях, связанных с определением активности цитохромов P450, обычно используются реконструированные системы с рекомбинантными белками, микросомы человека либо микросомы, полученные генно-инженерным способом, например, из клеток насекомых, трансфицированных бакуловирусом, несущим гены цитохромов P450 человека и CPR (Baculosomes™ или бакулосомы, Supersomes™ или суперсомы), или мембранные фракции, полученные из *Escherichia coli*, продуцирующих индивидуальные изоферменты цитохрома P450 и компоненты монооксигеназной системы человека (Bactosomes®), а также первичная культура гепатоцитов [63].

Недостатком использования реконструированных цитохром P450-содержащих систем может быть отсутствие информации о природных или об оптимальных редокс-партнерах исследуемого изофермента [25]. Кроме того, при реконструировании необходимо осуществлять подбор оптимального состава и количества фосфолипидов. Микросомальные препараты, полученные генно-инженерным способом (например, бакулосомы), позволяют экспрессировать необходимый изофермент цитохрома P450 или CPR, либо совместно в заданном соотношении [4].

Lahoz и соавт. был разработан подход к определению активности восьми изоферментов цитохрома P450: цитохрома P450 1A2 (CYP1A2), цитохрома P450 2A6 (CYP2A6), цитохрома P450 2B6 (CYP2B6), CYP2C9, CYP2C19, цитохрома P450 2D6 (CYP2D6), CYP2E1 и CYP3A4, основанный на использовании 96-

луночного планшета, покрытого фибронектином и засеянного первичной культурой гепатоцитов человека [64]. Гепатоциты, находящиеся в планшете, инкубировали с субстратами соответствующих изоферментов (фенацетин, кумарин, бензоксирезорифин, диклофенак, мефенитоин, буфуралол, хлорзоксазон, мидазолам). Активность изоферментов цитохрома P450 определяли количественным анализом образующихся метаболитов с помощью жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией. Разработанный подход обладает высокой чувствительностью и специфичностью за счет масс-спектрометрического определения метаболитов, а также возможностью использования минимального количества гепатоцитов. Авторы также отмечают, что для разработанного подхода определения активности цитохромов P450 необходимо использовать такие субстраты, которые обладали бы специфичностью к исследуемым изоферментам, а также субстраты, метаболиты которых могут быть определены с высокой чувствительностью методом масс-спектрометрии с электроспрейной ионизацией.

Таким образом, разработка новых эффективных, удобных с практической точки зрения аналитических подходов, обладающих высокой чувствительностью, для определения активности цитохромов P450 имеет большое значение для скрининга потенциальных ингибиторов и субстратов этих ферментов [46].

1.4. Электрохимические системы на основе цитохромов P450: механизмы электрокаталитических реакций и определение активности

Одной из пионерских работ по применению электрохимических систем для изучения свойств цитохромов P450, их восстановления и инициирования каталитической реакции была работа Scheller и соавт. [65]. Авторы показали, что электрохимические методы могут использоваться для восстановления NADP^+ , тем самым являясь альтернативой NADPH-регенерирующей ферментативной системе. Кроме того, электрохимические системы могут использоваться для восстановления кислорода, являющегося косубстратом цитохрома P450. Авторам также удалось

показать возможность электрохимического восстановления солюбилизированной формы цитохрома P450, при этом микросомальная форма электрохимически напрямую не восстанавливалась. Для усиления восстановления солюбилизированного цитохрома P450 авторы использовали метилвиологен как медиатор переноса электронов между электродом и ферментом. Для инициирования цитохром P450-зависимого метаболизма бензфетамина, аминопирин и *пара*-нитроанизола авторы применили электрохимическое восстановление кислорода, при этом были зарегистрированы соответствующие продукты ферментативных реакций. Позже группой Estabrook была получена электрохимическая система, в которой цитохромы P450, CPR и гибридные белки, содержащие как гемовые домены индивидуальных изоферментов цитохрома P450, так и флавиновые домены CPR находились в растворе и были способны осуществлять конверсию субстратов [66-68]. В качестве медиатора электронного переноса между электродом и активными центрами ферментов авторы использовали (S)-1,3,6,8,10,13,16,19-октаазабицикло[6.6.6]эйкозанокобальт (III) (сепульхрат кобальта), который при электрохимическом восстановлении был способен восстанавливать флавиновые кофакторы CPR и ионы железа гема цитохромов P450. Авторы показали, что скорости каталитических реакций, осуществляемые в полученной ими электрохимической системе, и скорости аналогичных реакций, протекающих при участии NADPH, сопоставимы в большинстве случаев. Таким образом, данные работы послужили предпосылкой для дальнейшего развития электрохимических систем для исследования цитохромов P450.

Современной стратегией определения активности цитохромов P450 является использование электрохимических систем, в которых фермент находится в иммобилизованном на электроде состоянии, а электрод служит источником электронов для прямого (безмедиаторного) восстановления иона железа гема и инициирования каталитической реакции по отношению к субстрату [1, 6, 69]. Иммобилизация цитохромов P450 на электроде позволяет уменьшить количество используемого фермента. Кроме того, с помощью различных методов химической

модификации электродов можно осуществлять контроль ориентации молекул фермента на электроде, повышать эффективность электрохимического восстановления цитохромов P450. Несмотря на перечисленные достоинства электрохимических систем, в которых фермент находится в иммобилизованном состоянии, хорошо известно, что иммобилизация ферментов может приводить к изменению их кинетических параметров, субстратной специфичности и других характеристик фермента вследствие его структурных изменений или изменений физико-химических свойств матрицы, используемой для иммобилизации [70, 71]. Для полноценного и стабильного функционирования цитохромов P450 в иммобилизованном состоянии, в том числе в электрохимических системах, необходимо учитывать особенности этих ферментов, поскольку только правильная конформация и ориентация на матрице способствуют доступу к активному центру субстрата и кислорода, а также высвобождению продукта реакции [71]. Все перечисленные факторы обуславливают интенсивное развитие технологий иммобилизации цитохромов P450, конечной целью которых является получение высокопроизводительных электрохимических систем для решения различных биомедицинских задач.

1.4.1. Теоретические аспекты функционирования электрохимических систем на основе цитохромов P450

Для исследования электрохимических свойств цитохромов P450 и реакций, катализируемых этими ферментами, широкое распространение получили методы вольтамперометрического анализа [2, 72]. Для дальнейшего обсуждения электрохимических систем, применяющихся для исследования цитохромов P450, необходимо рассмотреть важные теоретические основы электрохимического анализа.

Одним из важнейших методов является циклическая вольтамперометрия. Метод заключается в измерении тока при линейной развертке потенциала, подаваемого на рабочий электрод, при этом потенциал в конце цикла измерения

возвращается к первоначальному значению [73]. Циклическая вольтамперометрия позволяет исследовать механизмы и кинетику окислительно-восстановительных реакций, изучать процессы, протекающие на границе раздела фаз и зависящие от потенциала, например, адсорбционные процессы, а также с помощью данного метода часто удается идентифицировать промежуточные продукты реакций [73].

Для исследования электрохимических свойств различных веществ с помощью методов вольтамперометрического анализа наиболее часто используются трехэлектродные ячейки, в которых имеются рабочий электрод, вспомогательный электрод и электрод сравнения [73, 74]. Такие трехэлектродные ячейки позволяют компенсировать омическое падение напряжения в системе, при этом регистрируются истинные значения разности потенциалов между электродами, а получаемые вольтамперограммы представляют собой зависимости тока от потенциала рабочего электрода, а не приложенного напряжения [73, 74]. При наличии внешнего напряжения, изменяющегося с постоянной скоростью, рабочий электрод переходит в поляризованное состояние, при этом его потенциал изменится на величину приложенного напряжения. При достижении потенциала рабочего электрода, достаточного для восстановления или окисления вещества, через ячейку начинает протекать ток.

Рассмотрим диффузионно-контролируемую обратимую электрохимическую реакцию, представляющую собой гетерогенный процесс обмена электронами (переноса заряда) между электродом и веществом, находящимся в растворе:



где n – число электронов, участвующих в электрохимической реакции.

Потенциал электрода зависит от активностей окисленной (Ox) и восстановленной (Red) форм вещества и при равновесии уравнение Нернста может быть выражено следующим образом [75]:

$$E_{\text{eq}} = E^{0'} + RT \ln \frac{a[\text{Ox}]}{a[\text{Red}]}, \quad (2)$$

где E_{eq} – равновесный потенциал, В, $E^{0'}$ – формальный потенциал, В, R – универсальная газовая постоянная (8,314 Дж/моль К), T – абсолютная температура,

K , $a[\text{Ox}]$ – активность окисленной формы вещества, M , $a[\text{Red}]$ – активность восстановленной формы вещества, M . В этом случае ток через ячейку не протекает.

Для определения значения $E^{0'}$ с помощью циклической вольтамперометрии может быть использовано уравнение (3) [74]:

$$E^{0'} = \frac{(E_c + E_a)}{2}, \quad (3)$$

где E_c – потенциал пика восстановления (катодного пика), В, E_a – потенциал пика окисления (анодного пика), В.

Отметим, что уравнение (3) справедливо только для обратимых процессов, поэтому в ряде случаев рекомендуется использовать термин средний потенциал или полупотенциал пиков, рассчитанный из циклических вольтамперограмм [74]. Поскольку в биологических системах трудно проводить измерения при стандартных условиях, средний потенциал пиков, определяемый уравнением (3), часто обозначают E_m (англ. midpoint potential) [76], подчеркивая тем самым его отличие от $E^{0'}$, определяемого при стандартных условиях. Отметим, что для характеристики окислительно-восстановительных процессов, связанных с цитохромами P450, для обозначения среднего потенциала пиков в литературе часто используют обозначение E_m .

Если к электроду приложить дополнительный потенциал, то электрод переходит в поляризованное состояние, при этом разность между величиной приложенного потенциала и $E^{0'}$ называется перенапряжением:

$$\eta = E - E^{0'}, \quad (4)$$

где η – перенапряжение, В, E – приложенный потенциал, В.

Скорость переноса заряда между электрохимически активным веществом и поверхностью электрода определяется окислительно-восстановительными свойствами вещества, характеризующимися гетерогенными константами скорости переноса электронов для восстановительного (k_c) и окислительного (k_a) процессов, которые могут быть выражены уравнениями 5 и 6, соответственно [74]:

$$k_c = k_s e^{[-\alpha \frac{nF(E-E^{0'})}{RT}]}, \quad (5)$$

$$k_a = k_s e^{[(1-\alpha)\frac{nF(E-E^0)}{RT}]}, \quad (6)$$

где k_c – гетерогенная константа скорости переноса электронов для восстановительного процесса, м/с, k_s – стандартная гетерогенная константа скорости переноса электрона, м/с, e – основание натурального логарифма, k_a – гетерогенная константа скорости переноса электронов для окислительного процесса, м/с, α – коэффициент переноса (доля перенапряжения, увеличивающая скорость восстановительного процесса), F – постоянная Фарадея (96485 Кл/моль).

Для электрохимического процесса, представленного уравнением 1, ток описывается уравнением Батлера-Фольмера [74, 77]:

$$I = nFAk_s \left\{ \Gamma_{ox} e^{-\alpha \frac{nF}{RT}(E-E^0)} - \Gamma_{red} e^{(1-\alpha) \frac{nF}{RT}(E-E^0)} \right\}, \quad (7)$$

где I – ток, А, A – площадь электрода, м², Γ_{ox} – поверхностная концентрация окисленной (Ox) формы вещества, моль/м², Γ_{red} – поверхностная концентрация восстановленной (Red) формы вещества, моль/м².

Для обратимых процессов, контролируемых диффузией, ток восстановительного пика пропорционален корню квадратному из скорости развертки потенциала, согласно уравнению Рэндлса-Шевчика [74]:

$$I_p = 0,446nFA[X] \sqrt{\frac{nFvD}{RT}}, \quad (8)$$

где I_p – ток пика окисления или восстановления вещества X, А, $[X]$ – концентрация вещества X, М, v – скорость сканирования, В/с, D – коэффициент диффузии, м²/с.

Следовательно, диффузионно-контролируемый процесс окислительно-восстановительной реакции характеризуется линейной зависимостью тока пика от $v^{1/2}$.

Для обратимых электрохимических систем в отсутствие диффузии, т.е. в которых электроактивные молекулы адсорбированы на электроде или окислительно-восстановительный процесс протекает вблизи поверхности электрода, ток пиков линейно зависит от скорости сканирования и выражается следующим уравнением [78]:

$$I_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} \nu A \Gamma_0, \quad (9)$$

где Γ_0 – поверхностная концентрация электроактивного вещества на электроде, моль/м².

В этом случае окислительно-восстановительная реакция характеризуется линейной зависимостью тока пика от ν .

Из циклических вольтамперограмм может быть определено количество электроактивного вещества на поверхности электрода в соответствии с уравнением [77, 79]:

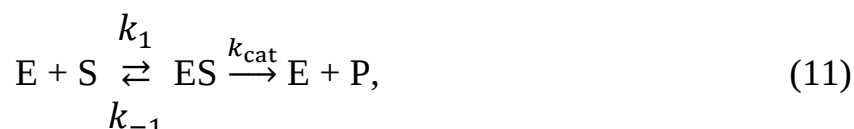
$$\Gamma_0 = \frac{Q}{nFA}, \quad (10)$$

где Q – заряд, Кл, который может быть вычислен из циклических вольтамперограмм путем интегрирования пика.

Гетерогенная константа скорости переноса электронов между адсорбированными электроактивными молекулами и электродом может быть определена экспериментально по методу Лавирона [80].

Для цитохромов P450 кинетика восстановления и окисления на электроде сильно зависит от спинового состояния иона железа гема и от вторичной структуры фрагмента белка, образующего активный центр [81].

Параметры стационарной кинетики иммобилизованного на электроде цитохрома P450 могут быть определены из электрохимической формы уравнения Михаэлиса-Ментен [2]. Рассмотрим процесс, катализируемый ферментом, находящимся в иммобилизованном состоянии на вращающемся дисковом электроде:



где E – фермент, S – субстрат, k_1 – константа скорости прямой реакции, М⁻¹ с⁻¹, k_{-1} – константа скорости обратной реакции, с⁻¹, ES – фермент-субстратный комплекс, k_{cat} – константа каталитическая, с⁻¹, P – продукт ферментативной реакции. Предельный ток (I_L) для данной реакции в стационарных условиях будет связан с массопереносом субстрата, межфазным обменом электронами между электродом и

электроактивным центром фермента, собственной кинетикой фермента и описываться уравнением Каутецкого-Левича [82-84]:

$$\frac{1}{I_L} = \frac{1}{I_{Lev}} + \frac{1}{I_E} + \frac{1}{I_{cat}}, \quad (12)$$

где I_L – предельный ток, А, I_{Lev} – ток Левича, А, I_E – ток, связанный с межфазным переносом электронов, А, I_{cat} – каталитический ток, связанный с собственной кинетикой фермента, А.

I_{Lev} может быть выражен уравнением:

$$I_{Lev} = 0,62nFAD^{\frac{2}{3}}[S]v^{-\frac{1}{6}}\omega^{\frac{1}{2}}, \quad (13)$$

где $[S]$ – концентрация субстрата, М, v – кинематическая вязкость раствора, м²/с, ω – частота вращения дискового электрода, рад/с.

I_E или ток обмена возникает за счет межфазного переноса электронов между электродом и первичным редокс-центром в ферменте и может быть описан уравнением 7.

При высоком перенапряжении I_E не лимитирует реакцию, и уравнение 12 можно упростить:

$$\frac{1}{I_L} = \frac{1}{I_{Lev}} + \frac{1}{I_{cat}}. \quad (14)$$

Каталитический ток, возникающий при взаимодействии фермента с субстратом, выражается электрохимической формой уравнения Михаэлиса-Ментен [81-84]:

$$I_{cat} = \frac{nFA\Gamma_0 k_{cat}[S]}{K_M + [S]}, \quad (15)$$

где K_M – константа Михаэлиса (М).

В уравнении 15 значение $nFA\Gamma_0 k_{cat}$ является максимальным каталитическим током (I_{max}) и постоянно для конкретной ферментативной реакции, протекающей в электрохимической системе.

Построив зависимость I_{cat} от концентрации субстрата, используя при этом методы вольтамперометрического анализа, в соответствии с уравнением 15, можно определить параметры стационарной кинетики иммобилизованного фермента, в том числе и цитохромов Р450. Однако стоит понимать, что в этом случае

полученное значение k_{cat} отражает не только каталитический процесс превращения субстрата в продукт реакции по монооксигеназному пути (рисунок 2 А), но и образование АФК вследствие неполного сопряжения каталитического цикла [1, 2, 85]. Пероксид водорода, образующийся в процессе электрохимического восстановления кислорода оксикомплекса цитохрома Р450, приводит к формированию из ферри-формы оксо-феррильной формы фермента, способной подвергаться электрохимическому восстановлению, что приводит к увеличению регистрируемого каталитического тока [81]. Пероксид водорода также может образовываться при прямом электрохимическом восстановлении кислорода на электроде [86]. Образующийся пероксид водорода может активировать окисление субстрата за счет пероксидазной активности цитохромов Р450 [11, 87] (рисунок 2 Б).

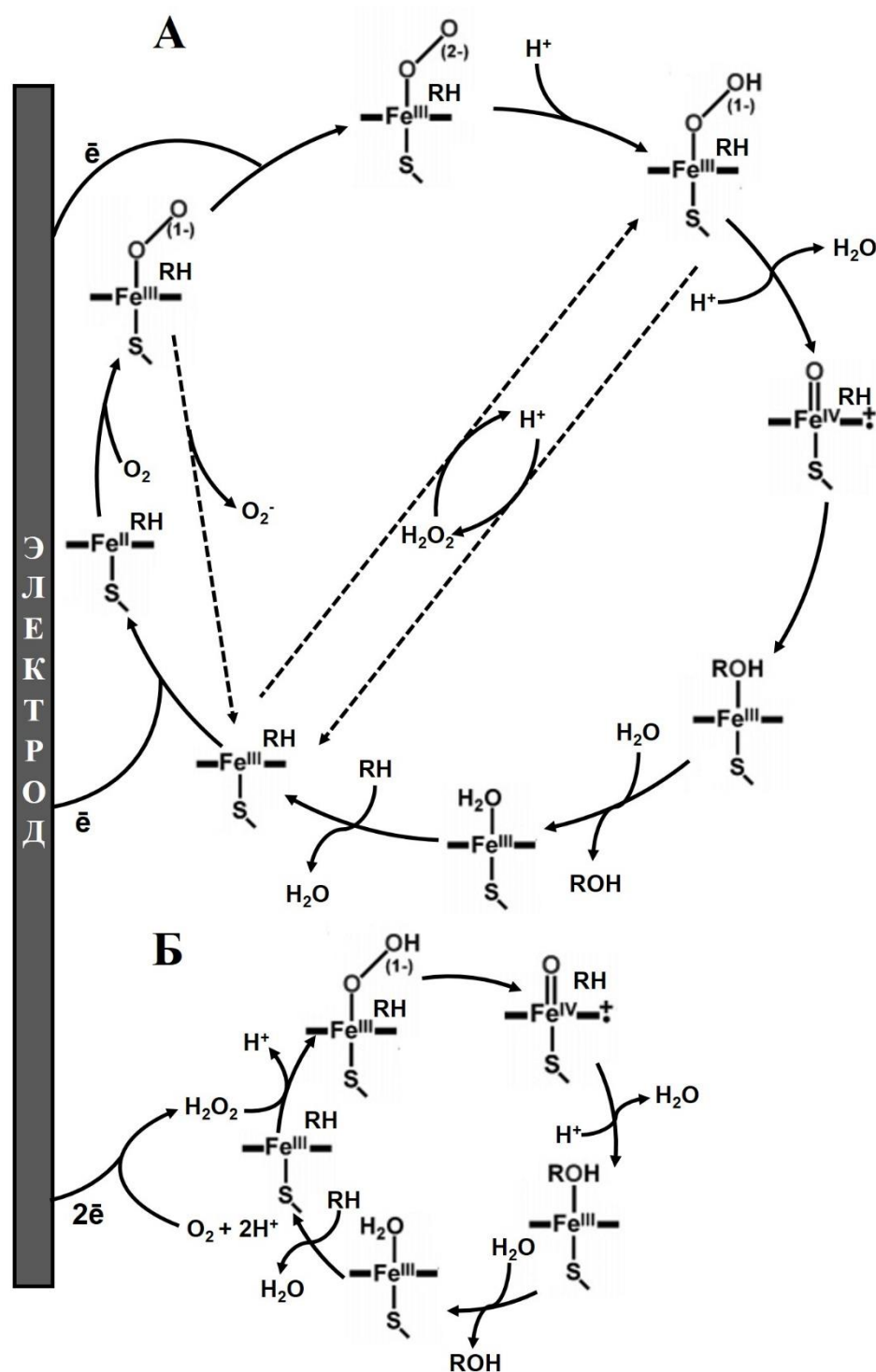


Рисунок 2. Электрокаталитические реакции, протекающие по монооксигеназному (А) и пероксидазному путям (Б). Пунктирными линиями показаны пути разобщения электрокаталитического процесса. RH – субстрат реакции, ROH – продукт реакции.

Другой проблемой, связанной с определением k_{cat} по каталитическому току, является возможность увеличения концентрации кислорода при внесении в электрохимическую систему аликвоты малополярного субстрата в органическом растворителе. Известно, что растворимость кислорода во многих органических растворителях больше, чем в воде [88, 89]. Поскольку цитохромы P450 крайне чувствительны к кислороду, увеличение концентрации последнего в электрохимической системе может вызывать дополнительное увеличение каталитического тока. Ранее было показано, что при титровании иммобилизованного CYP17A1 субстратами в этаноле, возникает каталитический ток, однако увеличение восстановительного тока ферментов наблюдалось и при внесении в систему этанола, хотя регистрируемый ток при этом имел меньшие значения, чем при титровании субстратами [90]. В этом случае, как правило, из значений тока, регистрируемого при внесении в систему субстратов в органическом растворителе, вычитают значение тока, регистрируемого при внесении органического растворителя без субстратов. Органические растворители могут также влиять на конформацию иммобилизованного фермента и структуру матрицы, используемую для модификации электрода, что сказывается на каталитическом токе.

Таким образом, результирующий каталитический ток может быть связан не только с продуктивным катализом, но и с рядом дополнительных процессов, влияющих на величину восстановительного пика цитохрома P450, что осложняет точное определение k_{cat} по электрохимической форме уравнения Михаэлиса-Ментен. В критической монографии Honeychurch был поставлен ряд ключевых вопросов, связанных с влиянием множества факторов на определение активности цитохромов P450 с помощью электрохимических систем [91].

Стоит отметить, что определяемое из зависимости I_{cat} от концентрации субстрата значение K_M для иммобилизованного цитохрома P450 часто используется как мера сродства фермента к субстрату в электрохимической системе [7, 92-95].

1.4.2. Электрохимические системы на основе очищенных цитохромов P450

На активность цитохромов P450 в электрохимических системах оказывает влияние конформационное состояние фермента на электроде, преобладание активной формы P450 над инактивированной – P420, что в значительной степени зависит от свойства самого электрода, его модификации и стратегии иммобилизации [1, 6]. Ниже мы рассмотрим ряд работ, в которых представлены наиболее распространенные способы иммобилизации очищенных цитохромов P450 (препаратов с высокой степенью очистки рекомбинантных или изолированных ферментов из микросом) на поверхности электродов.

1.4.2.1. Адсорбция цитохромов P450 на немодифицированных электродах

Цитохромы P450 могут быть адсорбированы на немодифицированных электродах, однако, как правило, не способны эффективно осуществлять каталитические реакции, хотя в ряде работ при адсорбции этих ферментов на немодифицированной поверхности электродов были получены достаточно высокие значения гетерогенных констант скорости переноса электронов [2, 96,]. В одной из пионерских работ Kazlauskaite и соавт. провели адсорбцию рекомбинантного камфорного цитохрома P450 на электрод из графита с плоской кромкой (англ. edge plane pyrolytic graphite) [97]. Циклической вольтамперометрией в анаэробных условиях была показана способность цитохрома P450 к обмену электронами между электродом и ионом железа гема, что подтверждалось наличием пиков восстановления и окисления со значением E_m -526 ± 11 мВ (отн. НКЭ), при этом в присутствии субстрата, камфоры, наблюдался сдвиг E_m до -390 ± 10 мВ (отн. НКЭ). Также в присутствии камфоры авторы наблюдали линейную зависимость тока восстановительного пика от $\nu^{1/2}$, что свидетельствовало о протекании диффузионно-контролируемого окислительно-восстановительного процесса для цитохрома P450, однако в отсутствие камфоры наблюдалось отклонение от линейной зависимости. Авторы объясняют данное

наблюдение меньшей скоростью переноса электронов между электродом и цитохромом P450 в отсутствие камфоры, по сравнению с аналогичным процессом, но в присутствии камфоры, что в свою очередь обусловлено реорганизацией иона железа гема фермента при связывании субстрата. Каталитическая активность адсорбированного на электроде цитохрома P450 подтверждалась регистрацией образования продукта реакции – 5-экзо-камфоры, однако авторы отмечают, что процесс каталитического окисления был медленным.

1.4.2.2. Иммобилизация цитохромов на электродах P450 с помощью тонких пленок

Поскольку цитохромы P450 млекопитающих локализованы в мембранах, для их функционирования в условиях *in vitro* является принципиально важным создание соответствующего по физико-химическим свойствам окружения. Поэтому для иммобилизации изоферментов цитохрома P450 на электроде могут использоваться как природные липиды, так и вещества, формирующие мембраноподобные структуры. Дидодецилдиметиламмония бромид (ДДАБ) представляет собой амфифильное соединение, формирующее на электроде бислойную мембраноподобную пленку, состоящую из гидрофобных алифатических хвостов и положительно заряженного атома азота, что позволяет имитировать мембранное окружение цитохромов P450 млекопитающих при иммобилизации и поддерживать определенную степень динамичности фермента [6, 98, 99]. Кроме того, ДДАБ имеет высокую степень проницаемости, что обеспечивает доступ компонентам электролита из раствора, способствуя переносу электронов с электрода на редокс центры фермента [99].

ДДАБ в качестве модификатора электродной поверхности впервые применялся группой Rusling для иммобилизации камфорного цитохрома P450 на поверхности электрода из пиролитического графита [98]. Авторам удалось зафиксировать прямой перенос электронов между электродом и ионом железа гема фермента. Позже Fleming и соавт. показали возможность прямого восстановления

и окисления флавиновых кофакторов и иона железа гема рекомбинантного цитохрома P450 102A1 (BM3) при его иммобилизации на электрод из пиролитического графита с плоской кромкой, модифицированный ДДАБ [100]. Johnson и соавт. провели иммобилизацию рекомбинантного CYP2C9 человека на электрод из пиролитического графита с ориентированной кромкой (англ. edge-oriented pyrolytic graphite), модифицированный ДДАБ [101]. В анаэробных условиях на циклической вольтамперограмме при pH 7,4 были зарегистрированы пики восстановления и окисления иона железа гема CYP2C9 со значением E_m -41 мВ (отн. НВЭ). Авторы показали, что зависимость E_m от pH имеет линейный характер, причем в случае использования 0,1 М калий-фосфатного буфера, значение наклона прямой было определено как -52,4 мВ/pH, а в случае 1,0 М калий-фосфатного буфера аналогичный параметр был равен -57,5 мВ/pH. Полученные значения были близки к теоретическому значению -59 мВ/pH, что указывает на равное количество переносимых электронов и протонов при протекании редокс-процесса на электроде. Связывание субстратов и ингибиторов с активными центрами цитохромов P450 вызывает изменение спинового состояния иона железа гема, что часто коррелирует со сдвигом E_m [102-105]. Johnson и соавт. [101] исследовали влияние субстратов и ингибиторов CYP2C9 на значение E_m . В присутствии торсемида, толбутамида и (S)-варфарина (субстраты CYP2C9) авторы наблюдали сдвиг E_m в область более положительных потенциалов на 22, 4 и 5 мВ, соответственно. При этом диклофенак (субстрат) и сульфафеназол (ингибитор) не вызывали изменения значений E_m . Существенный сдвиг значения E_m CYP2C9 в область более положительных потенциалов наблюдался в присутствии СО и O₂ (примерно на 50 мВ). Авторы заключили, что в отсутствие кислорода толбутамид, (S)-варфарин, диклофенак и сульфафеназол связываются на некотором расстоянии от гема, оказывая незначительное влияние на электронное окружение иона железа, при этом торсеמיד вызывал небольшой сдвиг E_m CYP2C9, однако авторы не могли объяснить этот факт только структурой торсемида. В другой работе с помощью ДДАБ была проведена иммобилизация рекомбинантного цитохрома P450 6A1 (CYP6A1) *Musca domestica* на электроде из пиролитического графита с плоской

кромкой для определения хлорорганических пестицидов – альдрина и гептахлора [106]. В анаэробных условиях наблюдался прямой перенос электронов между ионом железа гема СУР6А1 и электродом. Значение E^0 было определено как -0,36 В (отн. НКЭ). В присутствии кислорода и альдрина или гептахлора был зарегистрирован каталитический ток. Из полученных зависимостей каталитического тока, зарегистрированного в режиме амперометрии, от концентрации альдрина или гептахлора были рассчитаны значения K_M – 74,68 мкМ для альдрина и 43,16 мкМ для гептахлора. Предел определяемых концентраций для альдрина с помощью данного биосенсора составил 8 мкМ. Используя газовую хроматографию и масс-спектрометрию для детекции продуктов биотрансформации альдрина и гептахлора, авторы подтвердили каталитическую активность СУР6А1, иммобилизованного на электроде с помощью ДДАБ, по отношению к этим соединениям. В данной работе было также проведено исследование влияния ДДАБ на спектральные свойства СУР6А1. Растворы СУР6А1 в отсутствие или в присутствии ДДАБ были нанесены на кварцевую пластину и высушены на воздухе при комнатной температуре. Спектр поглощения СУР6А1 характеризовался полосой Соре в области 416 нм, при этом в присутствии ДДАБ полоса Соре сдвигалась до 409 нм. Эти результаты могут свидетельствовать об изменении микроокружения активного центра СУР6А1 в присутствии ДДАБ. Такие изменения могут влиять на электрохимические и каталитические свойства фермента при его иммобилизации на электроде с помощью данного модификатора.

1.4.2.3. Иммобилизация цитохромов Р450 с помощью метода послойного нанесения белка и полимерных пленок

Стратегия послойной (англ. layer-by-layer) иммобилизации ферментов на электроде основана на поочередном нанесении слоев модифицирующего соединения и ферментов. Формирующиеся слои могут быть стабилизированы за счет электростатических взаимодействий, водородных или ковалентных связей, а также взаимодействий по типу «гость-хозяин» [107]. Среди достоинств послойной

стратегии иммобилизации можно отметить возможность осуществлять контролируемый процесс нанесения слоев модифицирующего соединения и ферментов. На основе стратегии послойной иммобилизации ферментов разработан ряд электрохимических систем для определения активности очищенных цитохромов P450. В работе Lvov и соавт. была использована технология послойного нанесения пленок полистиролсульфоната (ПСС) или поли(диаллилдиметиламмония хлорида) (ПДДА) и камфорного цитохрома P450 на золотой электрод, предварительно модифицированный 3-меркапто-1-пропансульфоновой кислотой [108]. Авторы зафиксировали пики восстановления и окисления цитохрома P450 при использовании ПСС или ПДДА. Используя стирол в качестве субстрата, авторы подтвердили образование оксида стирола под действием фермента, иммобилизованного с помощью слоев ПДДА (скорость реакции была определена как $9,3 \text{ ч}^{-1}$). В контрольных экспериментах без фермента также происходило формирование оксида стирола, но его количество было примерно в 3 раза меньше, чем при проведении электрокаталитической реакции в присутствии фермента. Кроме того, авторы показали, что оксид стирола также образуется в присутствии 20 мМ H_2O_2 без электрокаталитической реакции, но его количество в 2,5 раза меньше, чем при проведении электрокаталитической реакции в присутствии фермента. Zu и соавт., используя аналогичный подход для иммобилизации камфорного цитохрома P450 и стирол в качестве субстрата, показали, что в присутствии каталазы происходит снижение скорости образования оксида стирола в 18,6 раз, что указывает на активирующую роль H_2O_2 по отношению к цитохрому P450 [109]. Используя также в качестве субстрата *цис*-метилстирол, авторы показали возможность фермента, иммобилизованного на электроде с помощью ПДДА, осуществлять электрокаталитическую конверсию этого субстрата до оксида *цис*- и *транс*-метилстирола. Стоит отметить, что ПДДА может использоваться не только для стратегии послойной иммобилизации цитохрома P450, но и как самостоятельный модификатор электродной поверхности. Так, Sadeghi и соавт. провели иммобилизацию CYP3A4, смешанного в эквимольном отношении с ПДДА, на стеклоуглеродный электрод (СУЭ) [110].

В анаэробных условиях авторы наблюдали прямой перенос электронов между электродом и ионом железа гема CYP3A4 (E_m был определен как -319 ± 7 мВ (отн. Ag/AgCl)). В присутствии кислорода и субстрата CYP3A4, эритромицина, авторы наблюдали каталитический ток. N-деметилазная активность CYP3A4, иммобилизованного с помощью ПДДА на электроде, по отношению к эритромицину подтверждалась путем количественного определения одного из продуктов каталитической реакции – формальдегида, образующего окрашенное производное в результате реакции Ганча. Значение k_{cat} составило около 6 мин^{-1} , при этом из зависимости каталитического тока от концентрации эритромицина была определена K_M как $86 \pm 3 \text{ мкМ}$, что хорошо согласовывалось с аналогичным параметром для реакции N-деметилирования эритромицина при участии микросом печени человека [111]. Разработанная электрохимическая система применялась авторами для определения ингибиторной активности кетоконазола, циметидина и диклофенака. Регистрируя активность CYP3A4 по отношению к 100 мкМ эритромицину, авторы определили значения концентраций кетоконазола, циметидина и диклофенака, которые уменьшали активность фермента на 50% (IC_{50}) – $135 \pm 10 \text{ нМ}$, $80 \pm 5 \text{ мкМ}$ и $311 \pm 20 \text{ мкМ}$, соответственно. Полученные значения были хорошо сопоставимы со значениями IC_{50} , полученными ранее для данных соединений [112-115]. Также была показана возможность применения разработанной системы для оценки кооперативного взаимодействия субстратов с CYP3A4. В присутствии $2,5 \text{ мкМ}$ хинидина авторы наблюдали снижение значения IC_{50} диклофенака по отношению к N-деметилазной активности эритромицина до $157 \pm 20 \text{ мкМ}$, что согласуется с ранее полученными данными об усилении ингибирующего действия диклофенака в присутствии хинидина по отношению к тестостерону, по-видимому, за счет механизм-активируемого ингибирования диклофенаком [114]. Munge и соавт., используя электрод из углеродной ткани, провели иммобилизацию камфорного цитохрома P450 с помощью пленок поли(этиленimina) [116]. Количество образующегося за 1 час электрокаталитической реакции оксида стирола при участии иммобилизованного фермента было определено как $10,2 \pm 0,1 \text{ нмоль}$ (скорость реакции $6,3 \text{ ч}^{-1}$), что

примерно в 7 раз больше, чем в случае проведения электрокаталитической реакции с модифицированным поли(этиленимином) электродом без фермента при тех же условиях. В работе Estavillo и соавт. сконструирована электрохимическая система на основе электрода из углеродной ткани, на который последовательно наносились слои ПСС и рекомбинантного CYP1A2 [117]. Методом циклической вольтамперометрии в анаэробных условиях авторы зарегистрировали пики восстановления и окисления иона железа гема CYP1A2 со значением E_m -0,31 В (отн. НКЭ). В присутствии кислорода и стирола как субстрата CYP1A2 авторы наблюдали каталитический ток. Чтобы оценить способность иммобилизованного на электроде CYP1A2 катализировать реакцию эпоксицирования стирола, авторы проводили электрокаталитические реакции при фиксированном потенциале рабочего электрода. Методом газовой хроматографии было показано, что за 1 час проведения электрокаталитической реакции образовывалось $8,8 \pm 2,3$ нмоль оксида стирола (скорость реакции определена как 39 ± 10 ч⁻¹). В присутствии каталазы оксида стирола не образовывалось. В качестве контроля авторы также провели электрокаталитические реакции с помощью электрода без фермента и показали, что при этих условиях было зарегистрировано образование оксида стирола примерно в 2,4 раза меньше, по сравнению с количеством, образующимся в электрокаталитической реакции при участии CYP1A2. Важно отметить, что авторы оценили возможность образования оксида стирола при активации иммобилизованного на электроде CYP1A2 пероксидом водорода. Иницируя реакцию внесением в систему с иммобилизованным CYP1A2 10 мМ H₂O₂, авторы зарегистрировали образование оксида стирола, при этом скорость реакции была определена как 54 ч⁻¹. Этот эксперимент подтверждает тот факт, что биотрансформация субстратов может происходить за счет активации пероксидазной активности цитохрома P450.

1.4.2.4. Инкапсулирование цитохромов P450 с помощью гелей

Для иммобилизации цитохромов P450 также применяется технология инкапсулирования ферментов. Sun и Wu разработали биосенсорную систему для определения бисфенола А на основе иммобилизованного CYP2C9, инкапсулированного в полиакриламидный гидрогель, на поверхности СУЭ [118]. В анаэробных условиях авторы регистрировали редокс-процесс, характеризующийся значением E^0 -0,427 В (отн. НКЭ). В присутствии бисфенола А наблюдался каталитический ток CYP2C9. При амперометрическом титровании иммобилизованного CYP2C9 бисфенолом А была получена зависимость каталитического тока от концентрации субстрата и определено значение K_M как 3,90 мкМ, однако авторы не подтверждали образование продукта каталитической реакции. Предел определяемых концентраций бисфенола А с помощью данного биосенсора составил 0,58 мкМ. Silveira и соавт. исследовали электрохимические свойства CYP1A2 и комплекса CYP1A2 с CPR, иммобилизованных на рабочих электродах из пиролитического графита с помощью инкапсулирования в матрицу гель-золь, полученную из смеси 55 мМ силиката натрия и 6% полиэтиленгликоля 400 (PEG 400), доведенной до pH 7,0 [119]. Авторы наблюдали, что добавки в систему водного раствора кофеина, являющегося субстратом CYP1A2, и одинаковых по объему аликвот воды вызвали одинаковое увеличение восстановительного тока CYP1A2, что позволило им сделать вывод об отсутствии монооксигеназной активности фермента по отношению к субстрату. Увеличение восстановительного тока фермента в ответ на внесение в систему водного раствора кофеина авторы связывали с одновременным внесением в систему растворенного кислорода, содержащегося в растворе субстрата. Авторы подчеркивают важность контроля концентрации кислорода в электрохимической системе при регистрации каталитических токов для оценки активности цитохромов P450. Несмотря на значимость сделанных авторами выводов, в работе не представлена информация о проведении экспериментов по регистрации образования продукта электрокаталитической реакции по отношению к кофеину под действием

иммобилизованного на электроде CYP1A2, подтверждающих отсутствие монооксигеназной активности фермента в электрохимической системе.

1.4.2.5. Ковалентная иммобилизация цитохромов P450 на поверхности электродов

Одним из самых трудоемких методов иммобилизации цитохромов P450 на электроде является ковалентная иммобилизация, хотя с помощью данного метода можно контролировать ориентацию ферментов на электроде. Fantuzzi и соавт. провели ковалентную иммобилизацию CYP2E1 на золотой электрод с помощью цистамина и малеимида [120]. В аэробных условиях авторы зарегистрировали пики восстановления и окисления со значением E_m -177 мВ (отн. НВЭ), что свидетельствует о способности иона железа гема фермента восстанавливаться и окисляться на электроде. В присутствии субстрата CYP2E1, *para*-нитрофенола, наблюдался каталитический ток. Из зависимости каталитического тока от концентрации субстрата была определена K_M (130 ± 3 мкМ). Кроме того, авторы спектрофотометрически зарегистрировали образование *para*-нитрокатехола, являющегося продуктом CYP2E1-зависимой биотрансформации *para*-нитрофенола, что подтверждает способность ковалентно иммобилизованного на электроде CYP2E1 осуществлять продуктивный катализ. Yang и соавт. провели ковалентную иммобилизацию CYP2C9 на золотом электроде с помощью самоорганизующихся монослоев 11-меркаптоундекановой кислоты и октантиола [121]. Иммобилизованный таким образом CYP2C9 был способен к обмену электронами с электродом, что было показано циклической вольтамперометрией в анаэробных условиях. Значение $E^{0'}$ было определено как -0,45 В (отн. Ag/AgCl). В присутствии кислорода и варфарина авторы наблюдали каталитический ток, при этом значение восстановительного тока возрастало при увеличении концентрации варфарина. Используя электрохимическую форму уравнения Михаэлиса-Ментен, авторы определили значение I_{max} и K_M , которые составили 417 мкА и 3 мкМ, соответственно. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

(ВЭЖХ) авторы зарегистрировали образование 7-гидроксиварфарина при участии CYP2C9, иммобилизованного на электроде. Учитывая количество образующегося продукта реакции, а также количество фермента в электрохимической и реконструированной системах, авторы установили, что активность фермента на электроде была в 35 раз больше, по сравнению с активностью фермента в реконструированной системе.

Fantuzzi и соавт. разработали микрофлюидные электрохимические платформы для определения активности CYP3A4 по отношению к лекарственным соединениям [122]. Авторы использовали метод ковалентной иммобилизации CYP3A4 на золотой поверхности рабочего электрода с помощью самоорганизующихся монослоев, сформированных 6-гексантиолом и 7-меркаптогептановой кислотой, карбоксильные группы которой были активированы 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлоридом и N-гидроксисукцинимидом для образования амидной связи с аминогруппами CYP3A4. В присутствии кислорода и хинидина, нифедипина, алосетрона или ондансетрона авторы наблюдали каталитический ток. Из зависимостей каталитического тока от концентрации этих соединений были определены значения K_M , которые хорошо согласуются с аналогичными значениями, полученными ранее с помощью альтернативных CYP3A4-содержащих систем [123-125]. В дальнейшем Fantuzzi и соавт. для высокопроизводительного определения K_M CYP3A4, CYP2C9 и CYP2D6 по отношению к лекарственным соединениям сконструировали электрохимическую систему на основе 8-луночного микропланшета. В каждой лунке такого микропланшета находились золотой рабочий электрод, углеродный вспомогательный электрод и хлоридсеребряный электрод сравнения [93]. Поверхность золотого рабочего электрода была модифицирована 8-гидроксиоктантиолом и 10-карбоксидекантиолом с последующей активацией карбоксильных групп 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлоридом и N-гидроксисукцинимидом для образования амидной связи с аминогруппами иммобилизуемых цитохромов P450. Лунки микропланшета с иммобилизованными ферментами заполнялись 200

мкл 50 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 500 мМ КСl, и далее в них вносились исследуемые субстраты в объеме 1 мкл. Каталитический ток, возникающий в ответ на добавку субстрата, регистрировался методом циклической вольтамперометрии. Из зависимостей каталитического тока от концентрации субстрата были определены значения K_M исследуемых цитохромов Р450 по отношению к ряду лекарственных соединений. В соответствии с полученными значениям K_M , авторы разделили все исследуемые субстраты на группы с низким и высоким сродством по отношению к соответствующим цитохромам Р450. Как утверждают авторы, время, которое требуется для определения K_M с помощью разработанной системы, составляет 15 мин.

Раниссо и соавт. разработали электрохимическую систему для оценки метаболизма лекарств при участии CYP2D6 и его полиморфных форм – CYP2D6*2 (R296C и S486T) и CYP2D6*17 (T107I, R296C и S486T) [7]. Ферменты были ковалентно иммобилизованы на золотом электроде, модифицированном 6-аминогексантиолом. Золотой электрод был последовательно модифицирован 6-аминогексантиолом и N-сукцинимидил-3-малеимидопропионовой кислотой, образующей ковалентные связи с меркаптогруппами иммобилизуемых белков. Авторы зарегистрировали пики восстановления и окисления для всех исследуемых белков, значения E_m были определены как -128 ± 35 мВ (отн. НВЭ), -166 ± 17 мВ (отн. НВЭ) и -186 ± 28 мВ (отн. НВЭ) для CYP2D6*1, CYP2D6*2 и CYP2D6*17, соответственно. В присутствии кислорода и субстрата буфуралола наблюдался каталитический ток, зависимость которого от концентрации субстрата описывалась электрохимической формой уравнения Михаэлиса-Ментен, согласно которой значения K_M для CYP2D6*1, CYP2D6*2 и CYP2D6*17 были определены как $8,9 \pm 1,9$ мкМ, $16,6 \pm 0,8$ мкМ и $26,2 \pm 3,7$ мкМ, соответственно. Используя ВЭЖХ, авторы зарегистрировали образование 1'-гидроксибуфуралола из буфуралола в электрохимической системе, и значения k_{cat} для CYP2D6*1, CYP2D6*2 и CYP2D6*17 были определены как $24,3 \pm 3,6$ мин⁻¹, $20,9 \pm 2,7$ мин⁻¹ и $14,7 \pm 0,4$ мин⁻¹, соответственно. Полученные кинетические параметры хорошо согласуются с ранее полученными данными [126-131].

Ковалентная иммобилизация цитохромов P450 в сочетании с сайт-направленным мутагенезом позволяет исследовать механизм переноса электронов между электродом и иммобилизованным белком, а также регулировать активность фермента за счет его ориентации на поверхности электрода. Зависимость электрокаталитической активности CYP2E1 от его ориентации на поверхности электрода была исследована в работе Мак и соавт. [132]. Авторы провели ковалентную иммобилизацию дикого типа CYP2E1 и его мутантных форм MUT261 (C268S, C480S, C488S) и MUT268 (C261S, C480S, C488S) с помощью самоорганизующихся слоев, образованных взаимодействием дитиобисмалеимидозтана с поверхностью золотых электродов. В мутантных формах белков все поверхностные остатки цистеинов были заменены на серин, кроме одного остатка цистеина в 261 положении для MUT261 и в 268 положении для MUT268. Все иммобилизованные белки были способны восстанавливаться и окисляться на электроде. Значение E_m для CYP2E1 и его мутантных форм находилось в области -243 ± 4 мВ (отн. Ag/AgCl). Используя в качестве субстрата *пара*-нитрофенол, авторы определили каталитическую активность иммобилизованных на электроде дикого типа CYP2E1, MUT261 и MUT268 путем спектрофотометрического определения *пара*-нитрокатехола, являющегося продуктом ферментативной реакции. Концентрация образующегося при участии MUT261 и MUT268 продукта была больше в 2,6 раза и 2 раза, соответственно, по сравнению с концентрацией продукта, образующегося при участии дикого типа CYP2E1. При этом для CYP2E1, MUT261 и MUT268 в реконструированной системе концентрация *пара*-нитрокатехола существенно не различалась. Авторы заключили, что такая разница в активности CYP2E1 и его мутантных форм в электрохимической системе связана с различной ориентацией ферментов на электроде. В CYP2E1 остатки цистеинов в 261 и 268 положениях находятся с проксимальной стороны относительно гема, в то время как остатки цистеинов в положениях 480 и 488 – с дистальной стороны. На дистальной стороне происходит связывание субстрата, которое может затрудняться при ковалентной иммобилизации CYP2E1 за счет остатков цистеина (C480 и C488). В MUT261 и

MUT268 остатки цистеинов на дистальной стороне гема заменены на остатки серина, следовательно, MUT261 и MUT268 связываются с электродом таким образом, что не возникает препятствий для взаимодействия с субстратом, что подтверждается образованием большего количества продукта. Кроме того, расположение проксимальной стороны белков MUT261 и MUT268 в непосредственной близости к поверхности электрода благоприятствует переносу электронов.

Rau и соавт. предложили ковалентную иммобилизацию камфорного цитохрома P450 через образование связи меркаптогрупп цистеиновых остатков фермента (Cys58 или Cys136) с N-(4-карбоксифенил)малеимидом, которым были функционализированы одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ), сорбированные на СУЭ [133]. Связывание фермента с модифицированным электродом проводилось в присутствии Тритон X-100 для предотвращения денатурации и необратимой адсорбции фермента на электроде или нефункционализированной поверхности ОУНТ. В анаэробных условиях и присутствии камфоры авторы зарегистрировали пики восстановления и окисления иона железа гема со значением $E_m -320 \pm 10$ мВ (отн. Ag/AgCl). В присутствии кислорода и камфоры наблюдался каталитический ток. Способность иммобилизованного фермента катализировать биотрансформацию камфоры была подтверждена обнаружением 5-экзо-гидроксикамфоры методом масс-спектрометрии с электроспрейной ионизацией.

1.4.2.6. Иммобилизация цитохромов P450 на поверхности электродов с помощью композитных материалов

Композитные материалы, использующиеся для модификации электродов, также нашли применение для иммобилизации цитохромов P450. Peng и соавт. осуществили иммобилизацию CYP2B6 на СУЭ с помощью композитного материала на основе наночастиц оксида циркония и коллоидного раствора платины, стабилизированного поли-L-лизинном [134]. CYP2B6, иммобилизованный

на электроде, был способен к обмену электронами между электродом и ионом железа гема. E^0 был определен как $-0,449 \pm 0,004$ В (отн. Ag/AgCl). Авторы зарегистрировали каталитический ток в присутствии кислорода и субстрата CYP2B6, лидокаина, а также определили значение K_M из зависимости каталитического тока от концентрации лидокаина. Однако в работе не описываются эксперименты по идентификации и количественному определению образующегося в процессе CYP2B6-зависимой электрокаталитической реакции продукта конверсии лидокаина, доказывающие способность CYP2B6 осуществлять продуктивный катализ на электроде при таком способе иммобилизации. Позже эта группа авторов провела иммобилизацию CYP2B6 на СУЭ с помощью композитного материала из золота и хитозана [135]. В этой работе авторы с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии с электроспрейной ионизацией показали способность иммобилизованного CYP2B6 осуществлять конверсию бупропиона, циклофосамида и лидокаина. Электрохимическая система на основе CYP3A4, коэкспрессированного с CPR и иммобилизованного на СУЭ с помощью композитного материала на основе полидопамин-функционализированной пены нанопористого оксида графена с различным размером пор, была разработана в работе Ху и соавт. [136]. Авторы показали, что с увеличением размера пор оксида графена электроактивная площадь электрода уменьшалась. Для иммобилизации CYP3A4 был использован композитный материал с минимальным размером пор пены оксида графена (65 нм). В анаэробных условиях авторы зарегистрировали прямой перенос электронов между ионом железа гема и электродом. В присутствии кислорода и субстратов CYP3A4 – тестостерона, прогестерона и эстрогена – авторы зарегистрировали каталитический ток. Из полученных зависимостей каталитического тока, зарегистрированного в амперометрическом режиме, от концентрации субстратов были получены значения K_M иммобилизованного на электроде фермента по отношению к субстратам: $110,70 \pm 18$ мкМ для тестостерона, $511,92 \pm 28$ мкМ для прогестерона и $450,88 \pm 30$ мкМ для эстрогена. Несмотря на активность CYP3A4, зарегистрированную по каталитическому току в присутствии субстратов, авторы не приводят данные по идентификации и

количественному определению образующихся при участии СУР3А4 метаболитов исследуемых субстратов, доказывающие способность иммобилизованного на электроде фермента осуществлять продуктивный катализ.

Таким образом, для иммобилизации очищенных цитохромов Р450 применяют различные в методологическом контексте стратегии. При этом для контроля стабильности иммобилизованного фермента используют регистрацию прямого переноса электронов между электродом и ионом железа гема, каталитического тока в присутствии субстрата и, главным образом, образование продуктов реакций, достоверно подтверждающих функциональную активность фермента на электроде. На рисунке 3 проиллюстрированы наиболее часто используемые способы иммобилизации очищенных цитохромов Р450 на электродах, рассмотренные выше.

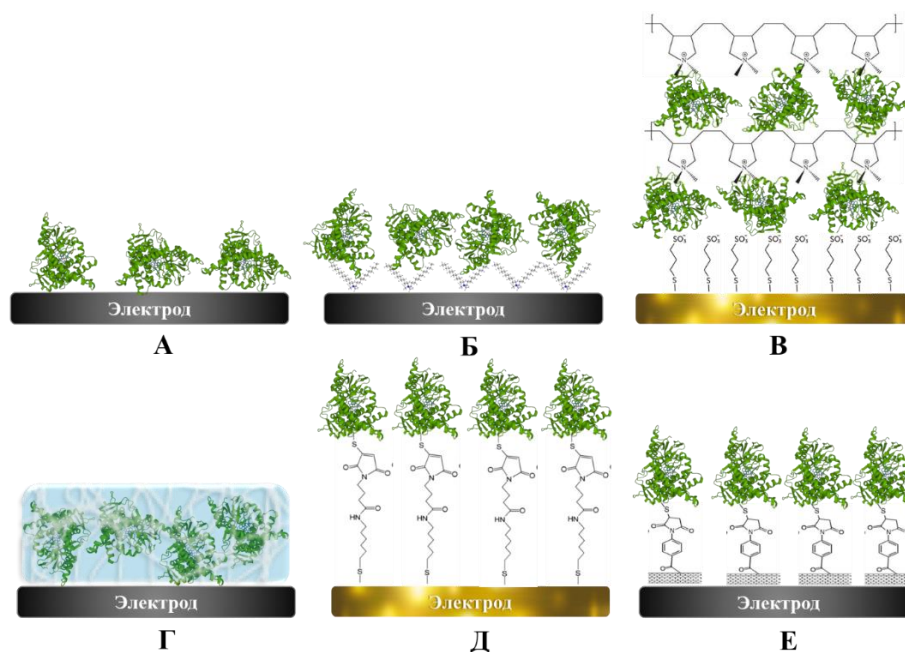


Рисунок 3. Способы иммобилизации очищенных цитохромов Р450 на электродах. Адсорбция на немодифицированных электродах (А); иммобилизация с помощью тонких пленок (Б) и метода послойного нанесения белка и полимерных пленок (В); инкапсулирование с помощью гелей (Г); ковалентная иммобилизация на золотых электродах, модифицированных тиольными соединениями (Д), или на СУЭ, модифицированном углеродными нанотрубками, функционализированными производными малеимида (Е).

1.4.3. Электрохимические системы на основе полусинтетических флавоцитохромов P450 и химерных цитохромов P450

С целью создания стабильных и высокоэффективных электрохимических систем для определения активности цитохромов P450 предложен ряд подходов, основанных на иммобилизации полусинтетических флавоцитохромов P450 и химерных белков на их основе, полученных генно-инженерным способом.

Впервые электрохимическая система на основе полусинтетических флавоцитохромов P450 была разработана Шумянцевой и соавт. [137]. Авторам удалось получить комплексы ковалентно связанного рибофлавина с CYP1A2 и цитохрома P450 2B4 (CYP2B4) и провести электрокаталитические реакции с помощью родий-графитовых электродов в присутствии полученных комплексов и субстратов. На основании количественного определения продуктов реакций авторы получили значения k_{cat} для полусинтетических флавоцитохромов P450 в электрохимической системе, которые были сопоставимы с аналогичным параметром в NADPH-зависимой системе.

Позже в работе Dodhia и соавт. была разработана электрохимическая система на основе химерных белков, состоящих из CYP3A4 и редуктазного (флавинсодержащего) домена CYP102A1 *Bacillus megaterium* или флаводоксина *Desulfovibrio vulgaris*, иммобилизованных на СУЭ, модифицированных ПДДА, или ковалентно на золотых электродах с помощью цистамин и N-гидроксисукцинимидного эфира (малеимида)пропионовой кислоты [138]. Циклические вольтамперограммы химерного белка, состоящего из CYP3A4 и редуктазного домена CYP102A1, иммобилизованного на СУЭ и золотом электроде, имели пики восстановления и окисления со значениями E_m -145 ± 18 мВ (отн. НВЭ) и -141 ± 11 мВ (отн. НВЭ), соответственно. В присутствии монооксида углерода авторы наблюдали смещение значения E_m в область более положительных потенциалов за счет образования комплекса СО и иона железа гема. Пиков от редуктазного домена зарегистрировано не было. Для сравнения авторы приводят данные циклической вольтамперограммы CYP3A4, иммобилизованного на СУЭ и

золотом электроде. Значения E_m для СУР3А4 были определены как -97 ± 11 мВ (отн. НВЭ) в случае иммобилизации фермента на СУЭ и -157 ± 17 мВ (отн. НВЭ) в случае иммобилизации фермента на золотом электроде. Для СУР3А4 также наблюдалось смещение E_m в область более положительных значений в присутствии монооксида углерода. Сравнительный анализ значений E_m , разности между значениями E_c и E_a (ΔE) и гетерогенных констант скоростей переноса электронов, полученных для СУР3А4 и СУР3А4 в составе химерного белка, позволил сделать вывод о вкладе флавинового домена СУР102А1 в перенос электронов между электродом и химерным белком. Кроме того, удаление флавиновых нуклеотидов из редуктазного домена СУР102А1 химерного белка приводило к появлению пиков на циклической вольтамперограмме с количественными параметрами, близкими к аналогичным параметрам пиков, полученных для СУР3А4. На циклической вольтамперограмме химерного белка, состоящего из СУР3А4 и флаводоксина, иммобилизованного на СУЭ, авторы наблюдали два пика восстановления и два пика окисления (значения E_m -102 ± 13 и -391 ± 10 мВ), что свидетельствовало о протекании редокс процессов, в которые вовлечены ион железа гема СУР3А4 и FMN флаводоксина. Однако при иммобилизации химерного белка СУР3А4 с флаводоксином на золотом электроде циклическая вольтамперограмма характеризовалась одним пиком восстановления и одним пиком окисления (E_m -136 ± 10 мВ), которые соответствовали редокс процессу, в который вовлечен ион железа гема СУР3А4 химерного белка. Авторы отмечают, что при иммобилизации как СУР3А4, так и химерных белков на СУЭ, значения гетерогенных констант переноса электронов гораздо больше, по сравнению с аналогичным параметром для белков, иммобилизованных на золотых электродах, что, по-видимому, связано с усилением переноса электронов между электродом и белками при иммобилизации последних с помощью поверхностно-активных или полиионных соединений. В заключение, авторы, используя в качестве субстрата СУР3А4 эритромицин, сравнили концентрации формальдегида, образующегося при N-деметилировании эритромицина, соотнесенные к количеству электроактивного белка на электроде, и эффективности сопряжения каталитического цикла. В присутствии редуктазного

домена CYP102A1 или флаводоксина в составе химерных белков происходило увеличение как концентрации образующегося формальдегида, так и эффективности сопряжения, по сравнению с аналогичными параметрами в случае иммобилизации CYP3A4 без редуктазного домена или флаводоксина. Удаление флавиновых нуклеотидов из редуктазного домена CYP102A1 химерных белков приводило к снижению этих параметров до значений близких к таковым в случае иммобилизации CYP3A4 без редуктазного домена или флаводоксина. Таким образом, авторы показали возможность контроля активности ферментов и эффективности сопряжения каталитического цикла при разработке электрохимических систем на основе цитохромов P450 для биосенсорного анализа и биоэлектрокатализа.

Rapicco и соавт. разработали электрохимическую систему на основе химерных белков, полученных генно-инженерным способом, состоящих из гемового домена CYP2C9*1 (дикий тип фермента), CYP2C9*2 (R144C) или CYP2C9*3 (I359L) и фрагмента флаводоксина *Desulfovibrio vulgaris*, содержащего FMN в качестве простетической группы [7]. Химерные белки были иммобилизованы на золотом электроде, модифицированном самоорганизующимися слоями на основе 6-гексантиола и 7-меркаптогептановой кислоты. Для всех химерных белков, содержащих CYP2C9*1, CYP2C9*2 или CYP2C9*3, авторы зарегистрировали восстановительный и окислительный пики со значениями E_m -79 ± 11 мВ (отн. НВЭ), -88 ± 4 мВ (отн. НВЭ) и -98 ± 8 мВ (отн. НВЭ), соответственно. Полученные пики отражали процесс восстановления и окисления иона железа гема химерных белков. В присутствии кислорода и (S)-варфарина авторы наблюдали каталитический ток. Значения K_M химерных белков, содержащих фрагменты CYP2C9*1, CYP2C9*2 или CYP2C9*3, по отношению к (S)-варфарину были определены из зависимости каталитического тока от концентрации субстрата в соответствии с электрохимической формой уравнения Михаэлиса-Ментен (0,84 мкМ, 1,76 мкМ и 6,24 мкМ, соответственно). С помощью ВЭЖХ авторы зарегистрировали образование (S)-7-гидроксиварфарина, количественное определение которого позволило рассчитать значения k_{cat} для

химерных белков: $15,75 \text{ мин}^{-1}$ – для химерного белка, содержащего CYP2C9*1, $6,85 \text{ мин}^{-1}$ – для химерного белка содержащего CYP2C9*2 и $2,17 \text{ мин}^{-1}$ – для химерного белка, содержащего CYP2C9*3. Позже Panіссо и соавт. провели иммобилизацию на СУЭ, модифицированных ДДАБ, CYP2C9 и химерных белков, состоящих из гемового домена CYP2C9*1, CYP2C9*2 или CYP2C9*3 и фрагмента флаводоксина *Desulfovibrio vulgaris*, содержащего FMN в качестве простетической группы [99]. Как CYP2C9, так и химерные белки были способны к обмену электронов между модифицированным электродом и ионом железа гема, о чем свидетельствовали полученные циклические вольтамперограммы. Чтобы показать механизм переноса электронов в химерных белках, авторы зарегистрировали циклические вольтамперограммы в присутствии монооксида углерода. Значения E_m химерных белков при насыщении монооксидом углерода сдвигались в более положительную область потенциалов, свидетельствуя о том, что наблюдаемые на циклической вольтамперограмме пики соответствуют процессу восстановления и окисления иона железа гема. Авторы сравнили активности CYP2C9 и химерных белков по отношению к (S)-варфарину в присутствии каталазы и супероксиддисмутазы. Для CYP2C9 по отношению к (S)-варфарину значение k_{cat} было определено как $4,28 \pm 0,59 \text{ мин}^{-1}$, при этом для химерного белка, состоящего из CYP2C9*1 и флаводоксина, авторы наблюдали увеличение значения k_{cat} примерно в 4 раза, что указывало на активирующую роль флаводоксина. Для химерного белка CYP2C9*2 с флаводоксином авторы наблюдали снижение значения k_{cat} примерно в 1,5 раза, а для CYP2C9*3 с флаводоксином – примерно в 7 раз, по сравнению с активностью химерного белка CYP2C9*1 с флаводоксином, что согласуется с данными литературы о сниженной активности CYP2C9*2 и CYP2C9*3 по отношению к (S)-варфарину [139]. Авторы полагают, что разработанная ими электрохимическая система на основе химерных белков может быть использована при оценке влияния полиморфизма на метаболизм лекарственных соединений.

1.4.4. Электрохимические системы на основе мембраносвязанных цитохромов P450

Наряду с созданием электрохимических систем на основе очищенных цитохромов P450, интенсивное развитие получили электрохимические системы на основе адсорбированных (иммобилизованных) на электродах микросом человека либо микросом, полученных из трансгенных организмов, продуцирующих индивидуальные изоферменты цитохрома P450 и компоненты монооксигеназной системы человека. Разработка таких систем диктуется рядом причин, важнейшими из которых являются: во-первых, отсутствие необходимости выделения цитохрома P450 из мембран, что позволяет избежать инактивации фермента в процессе выделения; во-вторых, ферменты остаются в своем естественном мембранном микроокружении, способствующим их стабилизации; в-третьих, все компоненты цитохром P450-зависимой монооксигеназной системы (цитохром P450, CPR, cyt b_5) находятся в оптимальном количественном соотношении. Все эти факторы позволяют получить электрохимическую систему с высокой монооксигеназной каталитической активностью. Однако при разработке электрохимических систем на основе микросом перед исследователями возникает ряд задач, связанных с выявлением механизма переноса электронов между электродом и компонентами микросом, оптимизацией способов иммобилизации микросом на электродах и подходов к регистрации каталитической активности мембраносвязанных цитохромов P450.

Для иммобилизации мембраносвязанных цитохромов P450 на электродах применяют технологии, схожие по принципу с теми, что используются при иммобилизации очищенных цитохромов P450. Далее мы рассмотрим примеры работы, в которых используются различные стратегии иммобилизации мембраносвязанных цитохромов P450.

1.4.4.1. Адсорбция мембраносвязанных цитохромов P450 на немодифицированных электродах

В отличие от очищенных цитохромов P450, которые при адсорбции на немодифицированных электродах теряют стабильность и активность, мембраносвязанные ферменты могут быть успешно адсорбированы на электроде с сохранением как способности электрода и редокс-белковых компонентов обмениваться электронами, так и каталитической активности ферментов за счет мембранного микроокружения [4]. В работе Walgama и соавт. была разработана электрохимическая система на основе адсорбированных на различных типах углеродных электродах микросом человека для исследования метаболизма лекарств и ингибирования цитохромов P450 [140]. Авторы зарегистрировали пики восстановления и окисления для микросом, адсорбированных на электродах, при этом значение $E^{0'}$ находилось в диапазоне от -0,45 до -0,47 В (отн. Ag/AgCl). Наибольшая скорость переноса электронов была зарегистрирована при адсорбции микросом на СУЭ. С другой стороны, большее количество электроактивного вещества регистрировалось в случае адсорбции микросом на электродах из пиролитического графита с плоской кромкой и высокоочищенного графита (англ. high-purity graphite), имеющих более дефектные, шероховатые поверхности, по сравнению с поверхностью СУЭ, и менее дефектными гидрофобными поверхностями электродов из базального плоского пиролитического графита (англ. basal plane pyrolytic graphite). Используя в качестве субстрата тестостерон, авторы методом ВЭЖХ подтвердили способность микросом, адсорбированных на электродах из высокоочищенного пиролитического графита, катализировать реакцию 6 β -гидроксилирования тестостерона. В присутствии кетоконазола активность микросом, адсорбированных на электроде, снижалась за счет ингибирования цитохромов P450, катализирующих 6 β -гидроксилирование тестостерона. В работе Walker и соавт. было проведено исследование по влиянию поверхностных свойств электродов из высокоочищенного графита на электрокаталитические свойства адсорбированных микросом человека [141].

Авторы использовали карбид кремниевую бумагу с различной степенью шероховатости (с зернистостью 60, 120, 400, 600 и 1200; чем меньше число зернистости, тем крупнее частицы абразивного материала) для полировки графитовых электродов с последующей адсорбцией на поверхность электродов микросом. Авторы зарегистрировали пики восстановления и окисления для микросом, адсорбированных на электродах с различной степенью шероховатости, при этом значения $E^{0'}$ определены как $-0,47 \pm 0,01$ В (отн. Ag/AgCl). Наибольшее количество электроактивного вещества на электроде с адсорбированными микросомами было получено при полировке электродов бумагой с зернистостью 120. Используя 3D оптический поверхностный профилометр, авторы определили коэффициент шероховатости электрода, который составил 8 мкм для электродов, полированных бумагой с зернистостью 120. При полировке электродов бумагой со степенью зернистости от 600 до 1200, значение гетерогенной константы скорости переноса электронов было более чем в 1,5 раза больше, по сравнению с аналогичным параметром, рассчитанным для электродов, полированных бумагой с зернистостью 120. Авторы предположили, что меньшая скорость переноса электронов между микросомами и электродами, полированными абразивным материалом с большим размером абразивных частиц, может быть связана с возникновением более неоднородной поверхности электродов и, как следствие, различной удаленностью редокс-центров микросомальных белков от электрода. При этом на электродах, полированных бумагой с зернистостью 120, с адсорбированными микросомами каталитический ток в присутствии кислорода был больше, по сравнению с каталитическим током, регистрируемым на электродах, полированных бумагой с большей зернистостью, с адсорбированными микросомами в присутствии кислорода. В заключение, авторы показали каталитическую активность по отношению к диклофенаку микросом, адсорбированных на полированных бумагой с зернистостью 120 электродах. Методом ВЭЖХ авторы зарегистрировали образование 4'-гидроксидиклофенака при проведении электрокаталитической реакции в присутствии диклофенака как

субстрата, что подтверждало монооксигеназную активность микросом, адсорбированных на электроде.

1.4.4.2. Иммобилизация мембраносвязанных цитохромов P450 на электродах с помощью тонких пленок

Мембраносвязанные цитохромы P450 могут быть иммобилизованы на электродах, модифицированных тонкими гидрофобными пленками органических соединений. В работе Mie и соавт. была разработана электрохимическая система, в которой мембранные фракции, полученные от *Escherichia coli* и содержащие CYP3A4 и CPR человека, были иммобилизованы на золотых электродах, модифицированных монослойными гидрофобными пленками различных тиолатов [142]. Циклической вольтамперометрией в анаэробных условиях были зарегистрированы пики восстановления и окисления (около -0,4 В отн. Ag/AgCl) только при иммобилизации мембранной фракции на золотом электроде, модифицированном бензентиолатом и нафталентиолатом. При насыщении буфера монооксидом углерода на циклической вольтамперограмме регистрировались два пика восстановления, причем пик с более положительным потенциалом, по-видимому, возникает вследствие смещения потенциала восстановления цитохрома P450, образующего комплекс с монооксидом углерода. Пик окисления при насыщении монооксидом углерода смещался в положительную область на 50 мВ, указывая на то, что данный пик является следствием окисления цитохрома P450. В присутствии кислорода авторы наблюдали исчезновение пика окисления и увеличение пика восстановления, что свидетельствует о протекании электрокаталитической реакции по отношению к кислороду. В присутствии тестостерона регистрировался каталитический ток, свидетельствующий об активности микросом по отношению к тестостерону. Из зависимости каталитического тока от концентрации тестостерона было определено значение K_m , которое оказалось сопоставимо с аналогичным значением, ранее полученным с помощью альтернативной системы [143]. В присутствии кислорода и кетоконазола,

ингибирующей активность CYP3A4, происходило резкое уменьшение восстановительного пика (значение тока было меньше, чем в присутствии кислорода без кетоназола), при этом тестостерон в присутствии кетоназола вызывал менее выраженное увеличение восстановительного пика. Способность микросом катализировать реакцию 6 β -гидроксилирования тестостерона была подтверждена определением соответствующего продукта методом ВЭЖХ. Позже Mie и соавт. иммобилизовали микросомы с экспрессированными CYP2C9 или его полиморфными формами (CYP2C9*2 или CYP2C9*3) на золотые электроды, модифицированные 4-аминотиофенолом, 4-гидрокситиофенолом, 4-карбокситиофенолом или тиофенолом [8]. В анаэробных условиях авторы зарегистрировали пики восстановления и окисления только при иммобилизации микросом на электродах, модифицированных 4-аминотиофенолом ($E^{0'}$ было определено как -0,399 В отн. Ag/AgCl) и тиофенолом ($E^{0'}$ было определено как -0,330 В отн. Ag/AgCl). При этом авторы предположили, что зарегистрированные пики могут соответствовать процессу восстановления и окисления цитохрома P450. Важно отметить, что при иммобилизации микросом на электродах, модифицированных 4-аминотиофенолом, интенсивность пиков зависела от pH. При значениях pH 5,5 и 8,4 четких пиков не наблюдалось. Данное обстоятельство связано со значением pK_a аминогруппы 4-аминотиофенола (pK_a 6,9). Авторы заключили, что при значениях pH, соответствующих частично протонированной форме 4-аминотиофенола, происходит перенос электронов между электродом и микросомами. В присутствии кислорода и субстрата CYP2C9 толбутамида авторы наблюдали стабильный каталитический ток при иммобилизации микросом на электродах, модифицированных 4-аминотиофенолом, тогда как каталитический ток при иммобилизации микросом на электродах, модифицированных тиофенолом, уменьшался при последующих измерениях. Дополнительные эксперименты, проведенные авторами, позволили высказать предположение, что снижение каталитического тока на электродах, модифицированных тиофенолом, связано с разрушением порфиринового кольца цитохрома P450 под действием АФК, таких как супероксид анион. При модификации электродов 4-аминотиофенолом

создается более гидрофильная поверхность, по сравнению с поверхностью, возникающей при модификации тиофенолом, поэтому концентрация образующегося супероксидного аниона у поверхности снижается при участии молекул воды, находящихся на гидрофильной поверхности, что и объясняет стабильность каталитического тока. Для определения кинетических параметров CYP2C9*1, CYP2C9*2 и CYP2C9*3 по отношению к толбутамиду авторы использовали для иммобилизации микросом электроды, модифицированные 4-аминотиофенолом. Значение K_M было определено из зависимости каталитического тока от концентрации толбутамида, при этом значение k_{cat} было определено методом ВЭЖХ по количеству образующегося 4-гидрокситолбутамида. Полученные кинетические параметры для CYP2C9*1 и CYP2C9*3 укладывались в диапазон значений кинетических параметров, полученных ранее с помощью альтернативных систем [144-147], что указывает на адекватность применения разработанной электрохимической системы на основе микросом для определения активности CYP2C9.

Отрицательный заряд фосфолипидов мембран микросом позволяет осуществить стратегию их иммобилизации за счет электростатического взаимодействия с электродом, модифицированным соединениями, несущими положительный заряд. Nerimetla и соавт. сконструировали электрохимическую систему, в которой бактосомы с CYP2C9 и CPR или CYP3A4 и CPR были иммобилизованы на выступающем в роли рабочего электрода кварцевом резонаторе, покрытом золотом и модифицированном цистеамином [148]. Используя кварцевые кристаллические микровесы (QCM, от англ. quartz crystal microbalance) и сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) авторы осуществляли контроль образования монослоев цистеамина на золотой поверхности и адсорбцию бактосом. Методом циклической вольтамперометрии в анаэробных условиях авторы зарегистрировали пики восстановления и окисления со значениями $E^{0'}$ для бактосом с CYP2C9 + CPR и CYP3A4 + CPR, равными -450 ± 40 мВ (отн. Ag/AgCl) и -440 ± 40 мВ (отн. Ag/AgCl), соответственно. Также были определены $E^{0'}$ для бактосом с CYP2C9, не содержащих CPR, и бактосом с CPR, но

не содержащих CYP2C9: -310 ± 20 мВ (отн. Ag/AgCl) и -450 ± 38 мВ (отн. Ag/AgCl), соответственно. Авторы предположили, что полученные значения E^0 указывают на то, что CPR является первичным акцептором электронов от электрода, а последующее восстановление иона железа гема цитохромов P450 происходит за счет переноса электронов от CPR. Все иммобилизованные на электроде бактосомы обладали каталитической активностью по отношению к кислороду, при этом потенциал начала катализа (E_{onset}) для бактосом с экспрессированным CYP2C9 без CPR имел более положительное значение, по сравнению с E_{onset} для бактосом с CYP2C9 и CPR. Кроме того, плотность тока, регистрируемая при восстановлении кислорода бактосомами, содержащими CYP2C9 и CPR, была больше, чем плотность тока восстановления кислорода бактосомами, содержащими CYP2C9 без CPR. В совокупности полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что CPR опосредует перенос электронов к цитохрому P450 и усиливает процесс электрокаталитического восстановления кислорода. Используя в качестве субстрата CYP2C9 диклофенак, авторы подтвердили методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии образование 4'-гидроксидиклофенака. Скорость образования этого продукта при участии иммобилизованных бактосом с CYP2C9 и CPR была почти в 5,6 раз больше, по сравнению со скоростью образования продукта в случае иммобилизации бактосом с CYP2C9, но без CPR. Особенно важно подчеркнуть, что для расчета скорости образования метаболита авторы использовали концентрацию цитохрома P450 в адсорбированных бактосомах, а не количество электроактивного вещества, определяемого из циклических вольтамперограмм, поскольку в случае иммобилизации бактосом с CYP2C9 и CPR сигнал на циклических вольтамперограммах регистрируется либо от CPR, либо от комплекса цитохрома P450 и CPR, что не позволяет определить истинное количество электроактивного цитохрома P450. Сравнительно меньшее количество 4'-гидроксидиклофенака образовывалось и в случае иммобилизации бактосом с экспрессированной CPR, но не содержащих цитохром P450. В присутствии каталазы скорости образования 4'-гидроксидиклофенака значительно увеличивались как в случае иммобилизации бактосом с CYP2C9 и CPR, так и в случае иммобилизации бактосом с CYP2C9, но

без CPR. Это интересное наблюдение авторы объясняют тем, что каталаза, катализируя распад пероксида водорода, препятствует перекисному окислению липидных мембран бактосом, что способствует более эффективному переносу электронов между CPR и цитохромом P450. Сделанное авторами наблюдение позволяет иначе взглянуть на роль пероксида водорода в электрохимических системах с мембраносвязанными и очищенными цитохромами P450, поскольку, как было показано в ряде работ, внесение каталазы в систему с иммобилизованным на электроде очищенным цитохромом P450 приводило к снижению активности фермента по отношению к субстрату [137, 149].

1.4.4.3. Иммобилизация мембраносвязанных цитохромов P450 с помощью метода послойного нанесения

Разработаны электрохимические системы для определения активности цитохромов P450, в которых используется технология послойного нанесения на электрод пленок органических соединений и микросом. В работе Sultana и соавт. была сконструирована электрохимическая система на основе бакулосом, содержащих CYP1A2 или CYP3A4, иммобилизованных на электроде из пиролитического графита, модифицированного слоями полиэтиленimina и ПСС, с последующей послойной адсорбцией микросом и полиэтиленimina [150]. Авторы зарегистрировали процесс восстановления и окисления для бакулосом, обогащенных CYP1A2 или CYP3A4, в обоих случаях характеризующийся E_m -0,49 В (отн. НКЭ). На основании сравнительного анализа окислительно-восстановительных потенциалов бакулосом и рекомбинантных CYP1A2 и CYP3A4, количества электроактивного белка, адсорбированного на электроде, а также экспериментов по насыщению адсорбированных на электроде бакулосом монооксидом углерода, авторы показали, что первичным акцептором электронов от электрода является CPR в составе бакулосом. Используя в качестве субстрата стирол, авторы зарегистрировали образование продукта CYP1A2- и CYP3A4-

зависимой биотрансформации субстрата – оксида стирола, образующегося в электрохимической системе при участии бакулосом.

Интересный подход для оценки токсичности метаболитов, образующихся при участии цитохромов P450, по отношению к ДНК был предложен Wasalathanthri и соавт. [151]. Авторы разработали микрофлюидную электрохимическую систему на основе электродов из углерода или базального плоского пиролитического графита, на которые были нанесены ПДДА, ПСС, металлополимер $[Ru(2,2\text{-бипиридил})_2\text{-(поли(4-винилпиридин))}_{10}](ClO_4)$, ДНК и микросомы печени крысы. Нанесение вышеуказанных компонентов проводилось таким образом, чтобы чередовать слои, несущие положительные и отрицательные заряды. Методом циклической вольтамперометрии были зарегистрированы пики восстановления и окисления со значением E_m -0,48 В (отн. НКЭ), свидетельствующие о прямом переносе электронов между электродом и микросомами. Электрокаталитические реакции при фиксированном потенциале рабочего электрода с иммобилизованными микросомами и ДНК проводились в потоке буфера, содержащего стирол, 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанон, N-нитрозопирролидин, N-(9H-флуорен-2-ил)ацетамид или бензо[α]пирен. Хорошо известно, что реакционноспособные метаболиты этих соединений, образующиеся при участии цитохромов P450, способны реагировать с ДНК [152-156], что приводит к расплетанию последней и повышению доступности гуанина или аддуктов аденина для металлополимера рутения, выступающего в качестве катализатора окисления пуринов. Эти процессы могут быть зарегистрированы по пику окисления в области 1,15 В (отн. Ag/AgCl). Таким образом, разработанная электрохимическая система имеет практическую значимость для фармакологии, поскольку позволяет выявлять образование генотоксичных метаболитов, образующихся при участии цитохромов P450.

1.4.4.4. Инкапсулирование мембраносвязанных цитохромов P450 с помощью гелей

Технология иммобилизации на электродах с помощью инкапсулирования ферментов в полимеры и гели также применяется для иммобилизации микросом и мембраносвязанных цитохромов P450. Ху и соавт. предложили электрохимическую систему, основанную на иммобилизации инкапсулированных в хитозан микросом с экспрессированными CYP2C9 и CPR на СУЭ, модифицированном наночастицами оксида индия-олова [94]. В анаэробных условиях авторы зарегистрировали пики восстановления и окисления со значением E_m -0,393 В (отн. НКЭ). При иммобилизации инкапсулированных в хитозан микросом на электрод в отсутствие наночастиц оксида индия-олова пиков не наблюдалось, что подтверждает необходимость в такой системе наночастиц для прямого переноса электронов между электродом и микросомами. Как полагают авторы, наночастицы оксида индия-олова могут образовывать трехмерные структуры, способствующие переносу электронов. В присутствии кислорода и субстрата CYP2C9 толбутамида авторы наблюдали каталитический ток. Измеряя каталитический ток при фиксированном потенциале рабочего электрода и титровании толбутидом, авторы определили K_M (202,84 мкМ), которая оказалась сопоставима с аналогичным параметром, полученным ранее с помощью альтернативных систем [143, 157, 158]. Авторы подтвердили образование 4-гидрокситолбутида с помощью хромато-масс-спектрометрического метода и масс-спектрометрией с электроспрейной ионизацией. Регистрируя значения каталитического тока в присутствии фиксированной концентрации толбутида и различных концентраций сульфазола, авторы определили значение IC_{50} для сульфазола как 1,592 мкМ, что было сопоставимо с ранее полученными значениями этого параметра с помощью альтернативной системы [159]. Позже Ху и соавт. провели иммобилизацию микросом человека на СУЭ, модифицированный хитозаном и наночастицами золота, образующих комплекс с поли-L-лизинном, ковалентно связанным с оксидом графена, инкапсулированных в полидопамин

[160]. В анаэробных условиях авторы зарегистрировали пик восстановления при $-0,447$ В (отн. НКЭ) и пик окисления при $-0,366$ В (отн. НКЭ). Авторы отметили, что золотые наночастицы увеличивают электроактивную площадь электрода, на что указывает уменьшение количества электроактивного вещества при иммобилизации микросом на поверхности электрода с использованием модификации без золотых наночастиц. В аэробных условиях и в присутствии тестостерона был зарегистрирован каталитический ток, свидетельствующий об электрокаталитической активности микросом по отношению к кислороду и тестостерону. Из зависимости каталитического тока, регистрируемого в амперометрическом режиме, от концентрации тестостерона авторы определили значение K_M как 175 ± 20 мкМ. Кетоконазол уменьшал величину каталитического тока в ответ на добавку тестостерона. Значение IC_{50} для кетоконазола было определено как $0,2527 \pm 0,0031$ мкМ. Методом ВЭЖХ и масс-спектрометрии авторы подтвердили способность микросом, иммобилизованных на электроде, катализировать конверсию тестостерона в 6β -гидрокситестостерон.

1.4.4.5. Иммобилизация мембраносвязанных цитохромов P450 за счет электростатического взаимодействия с функционализированными поверхностями электродов

Для получения электродов с адсорбированными на их поверхности микросомами также применялась технология, основанная на электростатическом взаимодействии микросом человека (за счет отрицательного заряда фосфолипидов) с магнитными наночастицами (Fe_3O_4), функционализированными положительно заряженным амином, и последующей адсорбцией полученных таким образом комплексов на электроде из пиролитического графита с плоской кромкой [95]. Для электродов с адсорбированными на их поверхности магнитными наночастицами, связанными электростатически с микросомами, методом циклической вольтамперометрии в анаэробных условиях авторы зарегистрировали пики восстановления и окисления со значением $E^{0'}$ $-0,46 \pm 0,01$ В (отн. Ag/AgCl).

Сравнительный анализ $E^{0'}$ со значениями этого параметра, полученными при аналогичных условиях из циклической вольтамперометрии, для магнитных наночастиц, адсорбированных на электроде и связанных с бактосомами, содержащими CPR, но не содержащими цитохром P450, или содержащими CYP2C9, но не содержащими CPR, выявил, что полученные пики восстановления и окисления для микросом человека, адсорбированных на электроде с помощью магнитных наночастиц, соответствуют редокс процессу, в который вовлечена CPR, содержащая FAD и FMN. В присутствии кислорода каталитический ток, зарегистрированный циклической вольтамперометрией на электродах с адсорбированными микросомами, связанными с магнитными наночастицами, оказался в 1,5 раза больше, по сравнению с каталитическим током, зарегистрированным на электродах с адсорбированными микросомами, не связанными с магнитными наночастицами. Авторы предположили, что причиной этого является более высокая плотность адсорбции и большая поверхностная концентрация микросом за счет магнитных наночастиц. Стоит отметить, что также был зарегистрирован каталитический ток в присутствии кислорода в случае адсорбции на поверхности электродов магнитных наночастиц, несвязанных с микросомами, что, по-видимому, обусловлено способностью Fe_3O_4 восстанавливать кислород. Монооксигеназная активность микросом, связанных с магнитными наночастицами, адсорбированных на электроде, была исследована по отношению к диклофенаку. Методами хроматографического и масс-спектрометрического анализов было показано образование 4'-гидроксидиклофенака, при этом его количество было почти в 3 раза больше, по сравнению с количеством 4'-гидроксидиклофенака, образующегося при проведении электрокаталитической реакции с электродом, на котором микросомы были адсорбированы напрямую без магнитных наночастиц. При проведении контрольных экспериментов с электродами, на которых были адсорбированы магнитные наночастицы без микросом, или с электродами, на которых адсорбированы бактосомы, не содержащие цитохром P450, образование 4'-гидроксидиклофенака не зарегистрировано, что подтверждает вклад в образование

продукта именно цитохрома P450 в составе микросом. В заключение, авторы показали возможность определения K_M для микросом, как непосредственно адсорбированных на электроде, так и адсорбированных на электроде за счет магнитных наночастиц, путем регистрации каталитического тока в амперометрическом режиме при титровании диклофенаком.

Для иммобилизации микросом или мембранных фракций, содержащих компоненты монооксигеназных систем, широко применяется технология модификации электродов различными композитными органо-неорганическими материалами. Такие материалы позволяют увеличить скорость переноса электронов между электродом и редокс-центрами иммобилизованных белковых компонентов. В работе Huang и соавт. была сконструирована электрохимическая система на основе бакулосом с экспрессированными CYP3A4 и CPR, иммобилизованных на СУЭ, модифицированном нанокompозитным материалом на основе коллоидного золота и графена, стабилизированного ПДДА [161]. В анаэробных условиях на циклической вольтамперограмме наблюдались пики восстановления и окисления ($E^{0'}$ $-0,482 \pm 0,003$ В (отн. НКЭ)), что указывает на возможность прямого переноса электронов между электродом, модифицированным нанокompозитным материалом, и микросомами. В аэробных условиях, используя вращающийся дисковый электрод, авторы зарегистрировали каталитический ток при титровании субстратом CYP3A4 нифедипином. В соответствии с электрохимической формой уравнения Михаэлиса-Ментен и методом двойных обратных координат, авторы определили значение K_M по отношению к нифедипину (1,30 мкМ). Авторы отмечают, что данный параметр значительно меньше, по сравнению с полученным ранее с помощью альтернативной системы [162]. На основании этого, авторы утверждают, что микросомы, иммобилизованные на электроде, модифицированном нанокompозитным материалом, имеют большую ферментативную активность. Хромато-масс-спектрометрическим методом авторы показали способность микросом, иммобилизованных на электроде, модифицированном нанокompозитом, осуществлять CYP3A4-зависимую конверсию нифедипина в дегидронифедипин.

Кетоконазол ингибировал активность микросом по отношению к нифедипину. Определяя значения каталитического тока в присутствии фиксированной концентрации нифедипина и различных концентраций кетоконазола, авторы определили значение IC_{50} для кетоконазола (0,23 мкМ) в этой системе.

1.4.4.6. Адсорбция на электродах, модифицированных углеродными нанотрубками

Для адсорбции микросом на электроде могут применяться углеродные нанотрубки. Электрохимическая биосенсорная система на основе микросом с экспрессированным CYP1A2 человека, иммобилизованных на печатных графитовых электродах (ПГЭ), модифицированных многостенными углеродными нанотрубками, была разработана Vaj-Rossi и соавт. для определения нестероидного противовоспалительного средства (НПВС) напроксена [163]. После математической обработки циклических вольтамперограмм, зарегистрированных в аэробных условиях, были визуализированы два пика восстановления при -560 мВ (отн. Ag/AgCl) и -380 мВ (отн. Ag/AgCl), которые авторы соотнесли с восстановлением CPR и CYP1A2, соответственно, в составе микросом. В присутствии напроксена авторы наблюдали небольшой сдвиг потенциалов пиков восстановления в положительную область, при этом значение тока возрастало при увеличении концентрации напроксена, что свидетельствовало о каталитической активности CYP1A2. Предел определяемых концентраций напроксена с помощью разработанного биосенсора был определен авторами как 16 ± 1 мкМ. Позже Vaj-Rossi и соавт. применили модификацию ПГЭ многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ) для создания биосенсора на основе иммобилизованных микросом с экспрессированными CYP3A4, CPR и *cyt b₅* [164]. Используя математическую обработку пиков, зарегистрированных циклической вольтамперометрией, авторы выявили два восстановительных пика: при -360 мВ (отн. Ag/AgCl) и -540 мВ (отн. Ag/AgCl), предположительно соответствующие процессам восстановления CYP3A4 и CPR. Пики при аналогичных потенциалах

были зарегистрированы и на немодифицированных электродах с адсорбированными микросомами, однако ток восстановления СУРЗА4 и количество электроактивного вещества на электроде были больше в случае иммобилизации микросом на ПГЭ, модифицированных МУНТ, по сравнению с немодифицированными ПГЭ. Микросомы, иммобилизованные на ПГЭ, модифицированных МУНТ, демонстрировали электрокаталитическую активность по отношению к кислороду и субстрату СУРЗА4 ифосфамиду, при этом регистрируемые токи были значительно больше, по сравнению с каталитическими токами, регистрируемыми при иммобилизации микросом на немодифицированных электродах. Предел определяемых концентраций ифосфамида с помощью разработанного биосенсора был определен как 4 ± 2 мкМ. Полученные авторами данные указывают на то, что МУНТ позволяют повысить количество электроактивного фермента на электроде и увеличивают чувствительность биосенсора за счет увеличения восстановительного тока.

Также разработаны электрохимические системы на основе микросом для определения активности флавинодержащих монооксигеназ (FMO). FMO – NADPH-зависимые микросомальные ферменты, катализирующие реакции оксигенирования нуклеофильных гетероатомов различных ксенобиотиков, в том числе лекарственных препаратов [165-167]. Наряду с цитохромами P450, FMO являются важнейшими ферментами I фазы метаболизма ксенобиотиков [166]. В работе Ikegami и соавт. были исследованы электрохимические свойства флавинодержащих монооксигеназ 1 и 3 (FMO1 и FMO3) в составе микросом, иммобилизованных на золотом электроде, модифицированном нафталентиолом [168]. Методом циклической вольтамперометрии в анаэробных условиях авторы зарегистрировали пики восстановления со значениями потенциалов примерно при -0,34 В (отн. Ag/AgCl) для электродов с иммобилизованными микросомами, содержащими FMO1, и -0,40 В (отн. Ag/AgCl) для электродов с микросомами, содержащими FMO3, при этом в обоих случаях отсутствовали пики окисления. Используя в качестве субстрата метил *para*-толил сульфид, авторы показали возможность определения значения K_M для FMO путем регистрации увеличения

восстановительного тока (каталитического тока) этих ферментов в присутствии кислорода при титровании раствором субстрата (метил-*para*-толил сульфид). Авторы отмечают, что поскольку отсутствует пик окисления FMO, невозможно определить значение k_{cat} .

На рисунке 4 представлены способы иммобилизации на электродах микросом или мембранных фракций, содержащих компоненты монооксигеназных систем.

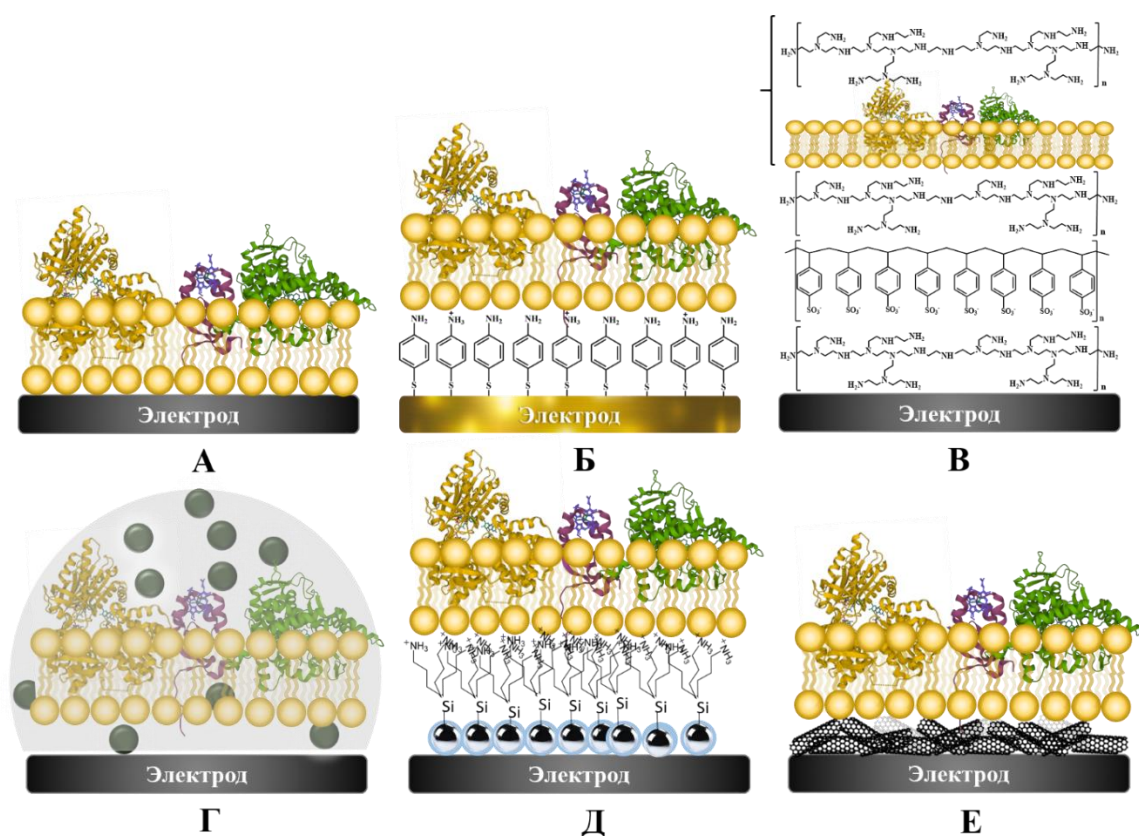


Рисунок 4. Способы иммобилизации на электродах микросом или мембранных фракций, содержащих компоненты монооксигеназных систем. Адсорбция на немодифицированных электродах (А); иммобилизация с помощью тонких пленок (Б) и метода послойного нанесения микросом или мембранных фракций и полимерных пленок (В); инкапсулирование с помощью композитных материалов на основе хитозана и оксида индия-олова (Г); иммобилизация за счет электростатического взаимодействия мембран микросом с модифицированными амино-функционализированными магнитными наночастицами (Д); адсорбция на электродах, модифицированных углеродными нанотрубками (Е).

1.5. Концепция биэлектродных электрохимических систем для определения активности ферментов

Как уже обсуждалось выше, исследование активности цитохромов P450 сопряжено с трудоемким аналитическим процессом определения продуктов реакций. Несмотря на удобство практического использования электрохимических систем для восстановления иона железа гема цитохромов P450 и инициирования таким образом каталитических реакций, для точного определения кинетических параметров необходим многоэтапный процесс количественного анализа продуктов. Одним из способов минимизации этапов этого процесса видится стратегия, основанная на использовании биэлектродной системы. В такой системе один электрод служит для иммобилизации очищенных или мембраносвязанных цитохромов P450 и инициирования каталитической реакции путем электрохимического восстановления иона железа гема, а другой электрод используется для количественного определения образующихся метаболитов за счет их электрохимического окисления или восстановления. Ранее в лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ под руководством профессора Шумянцевой была разработана биэлектродная система, в которой CYP2B4 был иммобилизован на одном из печатных электродов, модифицированных коллоидным золотом, образующийся в процессе каталитической реакции по отношению к бензфетамину, являющемуся субстратом этого фермента, пероксид водорода регистрировался с помощью второго электрода, модифицированного берлинской лазурью [169]. Мы предположили, что аналогичный принцип может применяться и для определения продуктов цитохром P450-зависимых реакций, при условии, что продукты и субстраты реакций отличаются по электрохимическим свойствам, а именно, подвергаются электрохимическому окислению при различных потенциалах.

Биэлектродные системы в различных форматах нашли применение для решения ряда исследовательских задач. Khushvakov и соавт. разработали электрохимическую систему для изучения [FeFe]-гидрогеназы *Clostridium pasteurianum* [170]. На вращающемся СУЭ с помощью разветвленного полимера на

основе кобальтоцена и этиленимина была проведена иммобилизация [FeFe]-гидрогеназы, которая при электрохимическом восстановлении была способна в свою очередь восстанавливать H^+ до H_2 . Образующийся водород регистрировался с помощью платинового электрода путем электрохимического окисления. Авторы полагают, что разработанный подход может использоваться для изучения каталитических механизмов других биотехнологически значимых H_2 -продуцирующих металлоферментов бактерий.

Часто биэлектродные системы применяются для решения аналитических задач. В работе Chen и соавт. был разработан иммуноанализ, основанный на использовании биэлектродной системы [171]. Авторы использовали гальваническую ячейку с двумя электродами. Один из электродов (анод), погруженный в отдельную камеру, являлся иммуноэлектродом, на котором были иммобилизованы антитела, взаимодействовавшие с конъюгатом щелочной фосфатазы и антител к щелочной фосфатазе. При ферментативном отщеплении фосфатной группы от аскорбат 2-фосфата образующийся аскорбат подвергался анодному окислению, при этом поток электронов восстанавливал ионы серебра (Ag^+) до металлического серебра (Ag^0) на другом электроде (катоде), также помещенном в отдельную камеру. Образующееся металлическое серебро далее определяли методом инверсионной вольтамперометрии. Авторы полагают, что разработанный подход может использоваться для иммуноанализа различных восстановителей. Ramašauskas и соавт. разработали электрохимическую систему для мониторинга глюкозы в режиме реального времени методом потенциометрии [172]. Один из электродов системы являлся золотым и использовался для иммобилизации глюкозодегидрогеназы путем ее связывания с золотыми наночастицами посредством 4-меркаптобензойной кислоты. Второй электрод системы был графитовым и модифицировался МУНТ с последующей иммобилизацией на них лакказы. При окислении D-глюкозы под действием глюкозодегидрогеназы до D-глюконо-1,5-лактона возникал поток электронов, восстанавливающих лакказу на втором электроде. Электрохимический потенциал электрода с иммобилизованной глюкозодегидрогеназой зависел от концентрации

глюкозы, при этом потенциал электрода с иммобилизованной лаказзой оставался стабильным за счет ферментативного восстановления кислорода до воды. Таким образом, аналитическим сигналом служила разность потенциалов между двумя электродами. Авторы показали специфичность разработанной системы по отношению к глюкозе, что позволяет использовать ее для количественного определения глюкозы в биологических жидкостях. Chansaenprak и соавт. предложили электрохимическую систему для определения глюкозы, в которой использовались два электрода [173]. СУЭ, модифицированный восстановленным оксидом графена и выступающий в качестве биоанода, использовался для иммобилизации глюкозодегидрогеназы с помощью поли(толуидина-синего О). Графитовый электрод, модифицированный МУНТ и выступающий в качестве биокатода, использовался для иммобилизации глюкозооксидазы и пероксидазы хрена. Поскольку биоанод и биокатод катализируют превращение одного и того же субстрата, оба электрода находились в непосредственной близости друг от друга без использования дополнительных отграничительных мембран, что позволило снизить омические потери. На биоаноде протекала NAD^+ -зависимая реакция окисления D-глюкозы до D-глюконолактона под действием глюкозодегидрогеназы с последующим реокислением NADH. На биокатоде протекала реакция восстановления пероксидазы электронами от электрода, при этом образующийся пероксид водорода в реакции окисления D-глюкозы до D-глюконолактона под действием глюкозооксидазы превращался в воду при участии пероксидазы. Ток, возникающий при реокислении NADH на биоаноде, служил аналитическим сигналом концентрации глюкозы. Диапазон концентраций глюкозы, который мог быть зафиксирован с помощью разработанной системы составляет 0,1-7,0 мМ, что указывает на то, что сенсор может использоваться для определения концентрации глюкозы как в крови, так и в моче. Достоинствами системы является возможность автономной работы без внешнего источника питания и отсутствие необходимости использования отграничительных мембран для биоанода и биокатода.

1.6. Электрохимическое определение метаболитов лекарственных соединений

При участии различных изоферментов цитохрома Р450 большое число лекарственных соединений подвергается реакциям ароматического гидроксилирования или О-деалкилирования, приводящим к образованию гидроксильных групп в составе ароматического кольца (таблица П1 в приложении). К таким лекарственным соединениям относятся отдельные представители адрено- и симпатомиметиков, адреноблокаторов, антиаритмических средств, антикоагулянтов, гипогликемических и Н1-антигистаминных средств, ингибиторов протонного насоса, миорелаксантов, средств для наркоза, НПВС, противоэпилептических и снотворных препаратов, средств для лечения ВИЧ-инфекции, статинов, тетрациклических антидепрессантов, эстрогены, гестагены, их гомологи и антагонисты [139]. Многие лекарственные соединения из этих фармакологических групп участвуют в возникновении межлекарственных взаимодействий.

Метаболиты цитохром Р450-зависимых реакций, например, содержащие гидроксифенильные группы, образующиеся в результате ароматического гидроксилирования, могут быть определены методами электрохимического анализа за счет их прямого электрохимического окисления. На рисунке 5 представлен общий механизм электрохимического окисления соединений, содержащих гидроксифенильные группы.

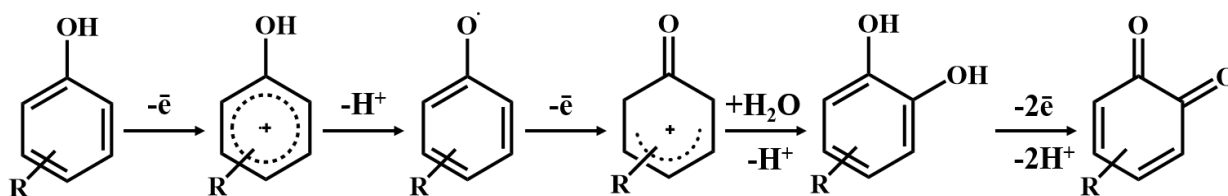


Рисунок 5. Общий механизм электрохимического окисления соединений, содержащих гидроксифенильные группы [174].

Электрохимический потенциал окисления ароматического кольца меньше, чем в случае окисления алифатических углеводородов, вследствие резонансной стабилизации ароматических катион-радикалов [175]. Гидроксильная группа в составе бензольного кольца облегчает процесс электрохимического окисления продуктов ферментативных реакций, поскольку электронодонорные группы, такие как гидроксильные и аминогруппы, активируют ароматическое кольцо, и электрохимический потенциал окисления таких соединений имеет меньшие значения. Гидроксилирование ароматических гетероциклов в составе лекарственных препаратов также может влиять на электрохимические свойства таких соединений. Различия в электрохимических свойствах субстратов цитохрома P450 и продуктов их биотрансформации могут использоваться для идентификации и количественного определения этих соединений, при этом в идеале не требуются дополнительные стадии их разделения при условии неперекрывающихся потенциалов электроокисления.

1.6.1. Электрохимическое определение продуктов реакций ароматического гидроксилирования

Как было сказано выше, метаболиты цитохром P450-зависимых реакций, образующиеся в результате ароматического гидроксилирования, подвергаются прямому электрохимическому окислению при меньших значениях потенциалов, чем в случае окисления соответствующих субстратов.

В ряде работ были исследованы электрохимические свойства субстратов и продуктов их конверсии, осуществляемой при участии цитохромов P450. Одним из путей метаболизма тетрациклического антидепрессанта миансерина является реакция ароматического гидроксилирования с образованием 8-гидроксимиансерина, осуществляемая при участии CYP2D6, а также при участии CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4 [176, 177] (рисунок 6).

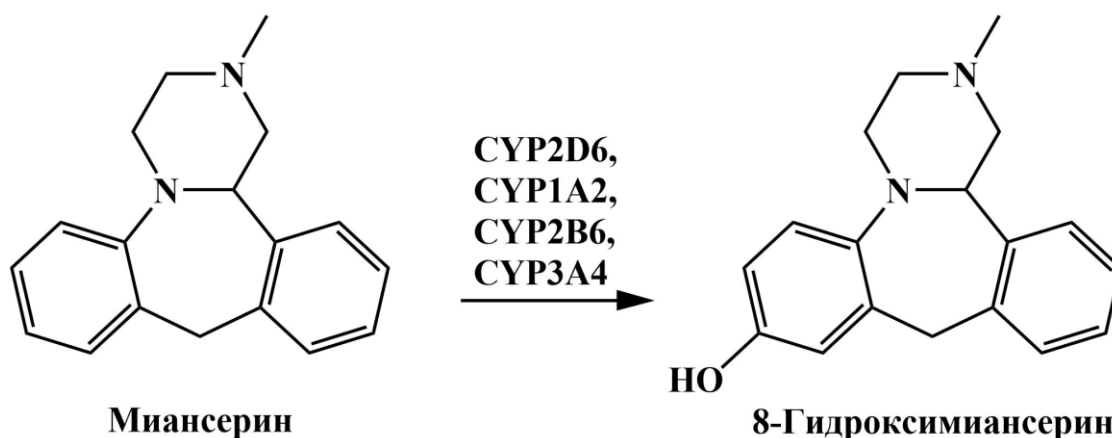


Рисунок 6. Реакция метаболизма миансерина при участии CYP2D6, CYP1A2, CYP2B6 и CYP3A4.

Миансерин способен подвергаться электрохимическому окислению при потенциале около 1,05 В (отн. Ag/AgCl), при этом показано, что 8-гидроксимиансерин подвергается электрохимическому окислению при меньших потенциалах, по сравнению с миансерином [178]. Несмотря на то, что авторы используют электрохимические свойства аналитов для их детекции в плазме крови после хроматографического разделения, различия в электрохимических свойствах могут быть также использованы для совместного определения миансерина и 8-гидроксимиансерина *in vitro* без дополнительных стадий разделения.

Трициклический антидепрессант имипрамин при участии CYP2D6 подвергается ароматическому гидроксированию с образованием 2-гидроксиимипрамина [179] (рисунок 7). Кроме того, N-деметилование имипрамина при участии CYP1A2, CYP2C19 и CYP3A4 приводит к образованию дезипрамина, который подвергается ароматическому гидроксированию при участии CYP2D6 до соответствующего 2-гидрокси производного [179].

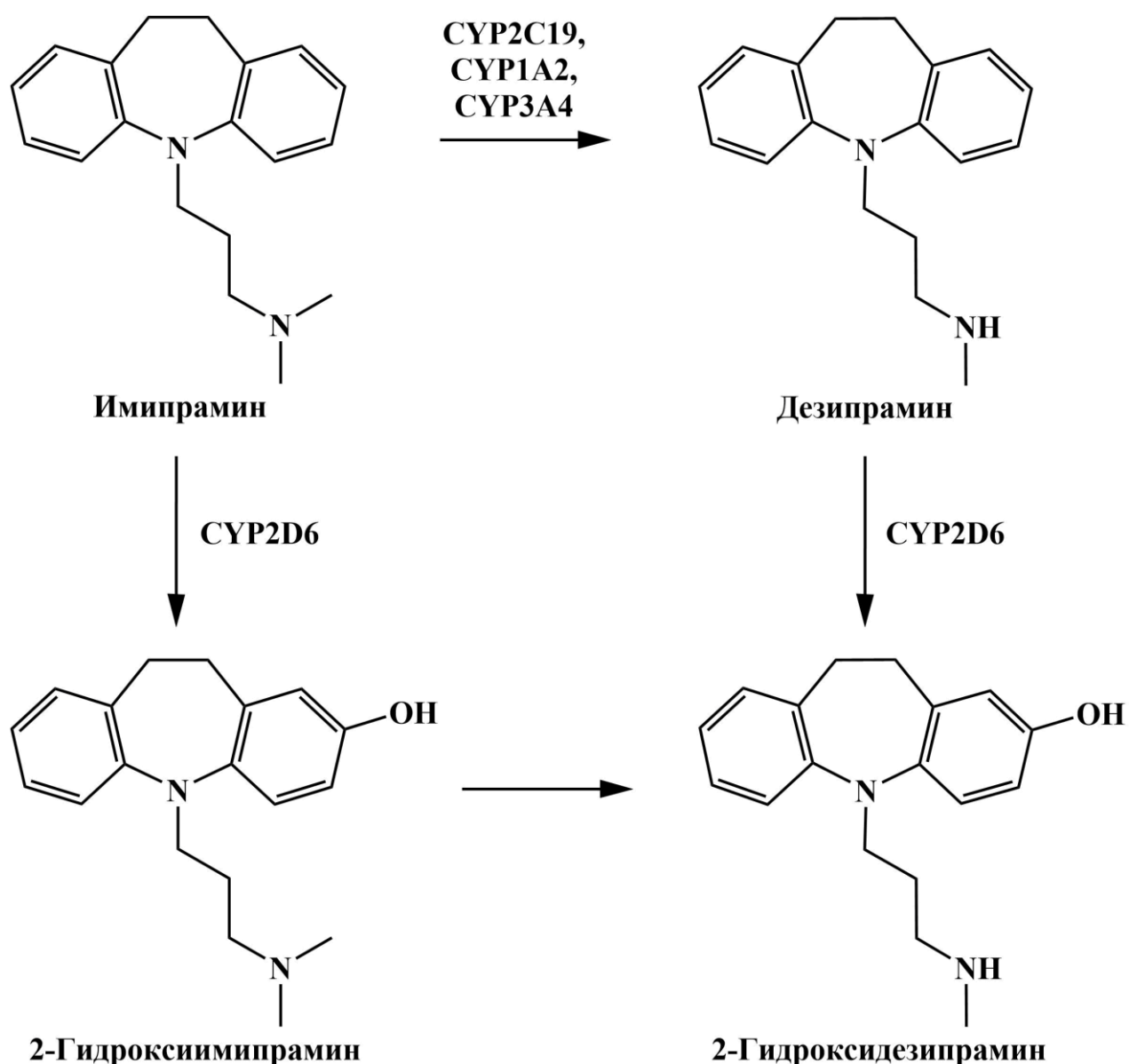


Рисунок 7. Реакции метаболизма имипрамина при участии CYP2C19, CYP1A2, CYP3A4 и CYP2D6. Адаптировано из работы Nguyen и соавт. [179].

При изучении вольтамперных кривых имипрамина, дезипрамина и их соответствующих 2-гидроксиметаболитов с помощью СУЭ Коуата и соавт. отметили, что 2-гидрокси производные имеют меньшие потенциалы окисления, по сравнению с имипрамином и дезипрамином [180]. Как и в случае с миансерином, авторы предлагают проводить хроматографию для последующего электрохимического определения имипрамина, дезипрамина и их соответствующих 2-гидроксиметаболитов в плазме крови и моче, однако различия в электрохимических свойствах этих лекарственных соединений и их метаболитов

могут быть использованы для совместного количественного определения без дополнительных стадий разделения. Поскольку имипрамин и дезипрамин могут быть использованы в качестве маркерных субстратов CYP2D6 при проведении ингибиторного анализа [181, 182], определение их 2-гидроксиметаболитов электрохимическими методами, основанными на различии электрохимических свойств субстратов и продуктов реакции, представляет интерес.

НПВС диклофенак подвергается преимущественно реакциям 4'-гидроксилирования при участии CYP2C9 и 5-гидроксилирования при участии CYP3A4 [183] (рисунок 8).

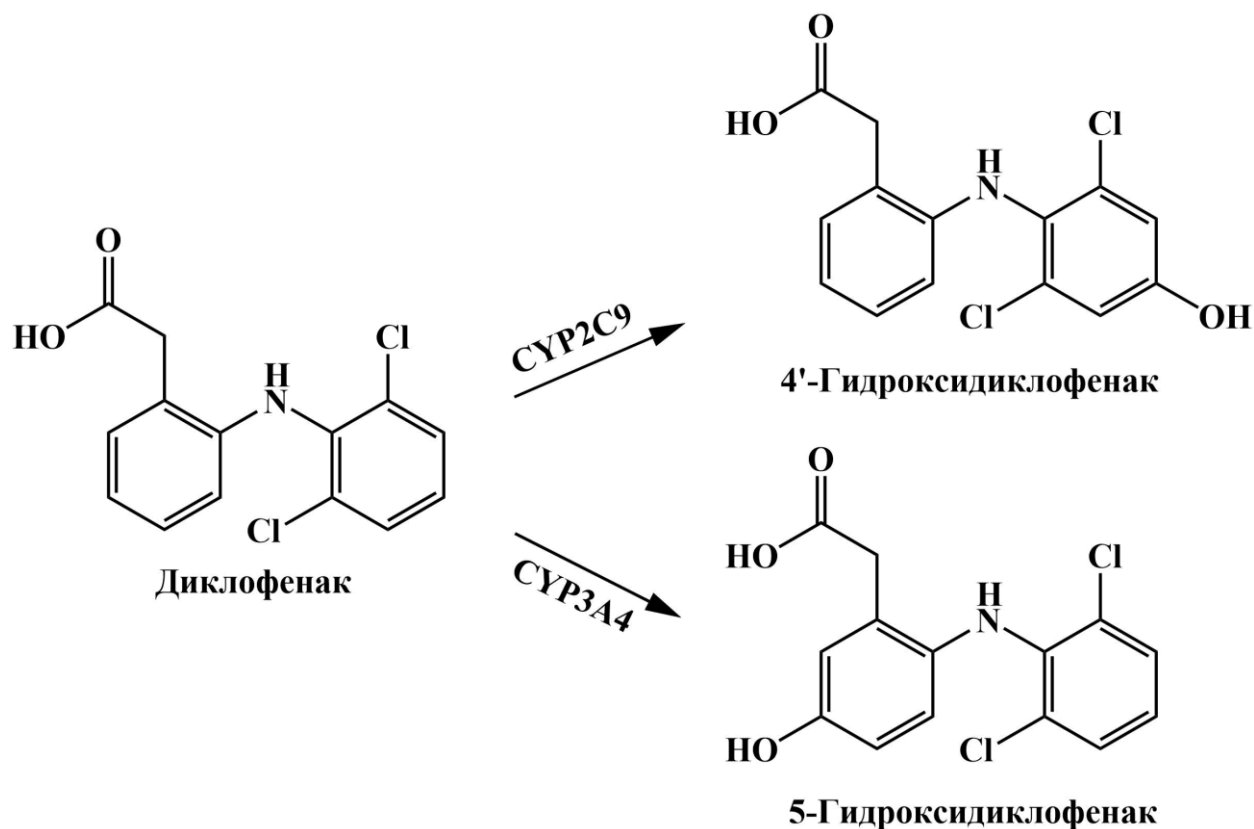


Рисунок 8. Реакции метаболизма диклофенака при участии CYP2C9 и CYP3A4.

Диклофенак имеет пик электрохимического окисления в области 0,5-0,7 В (отн. Ag/AgCl) [184-186]. Для 4'-гидроксидиклофенака методом циклической вольтамперометрии Madsen и соавт. регистрировали пик окисления при 0,236 В

(отн. Ag/AgCl) и пик восстановления при -0,131 В (отн. Ag/AgCl) в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4), при аналогичных условиях пики для 5-гидроксидиклофенака были зарегистрированы при 0,167 В (отн. Ag/AgCl) и -0,439 В (отн. Ag/AgCl), соответственно [187]. Поскольку диклофенак является маркерным субстратом CYP2C9, он наиболее часто используется для определения активности этого фермента [188, 189, 190], и, таким образом, электрохимические методы определения диклофенака и его метаболитов могут использоваться в фармакологических исследованиях при скрининге ингибирующей активности лекарственных соединений по отношению к CYP2C9.

НПВС, принадлежащие к группе оксикамов, такие как лорноксикам, пироксикам, подвергаются ароматическому гидроксигированию по пиридиновому радикалу под действием CYP2C9 с образованием соответствующих 5'-гидроксипроизводных [191, 192] (рисунок 9).

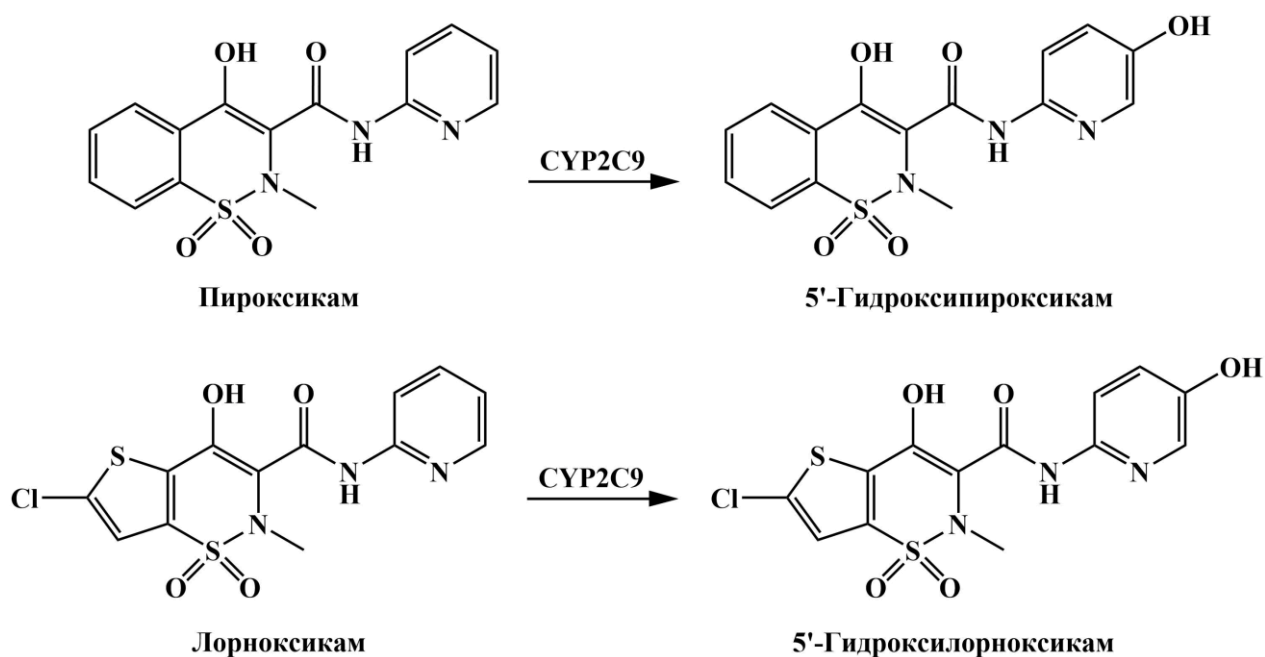


Рисунок 9. Реакции метаболизма пироксикама и лорноксикама при участии CYP2C9.

Suwa и соавт., исследуя электрохимические свойства лорноксикама и его 5'-гидроксиметаболита методом гидродинамической вольтамперометрии, показали различие в электрохимических свойствах этих соединений, обусловленное

наличием гидроксильной группы у 5'-гидроксиорноксикама [193]. Различия в электрохимических свойствах оксикамов и их 5'-гидроксилированных производных позволяют сделать предположение, что активность CYP2C9 может исследоваться путем количественного электрохимического определения 5'-гидроксиметаболитов оксикамов. Однако при выборе данного субстрата для оценки активности CYP2C9 стоит учитывать, что пироксикам проявляет ингибирующие свойства по отношению к ферменту [192].

Нейролептик хлорпромазин подвергается ароматическому гидроксигированию при участии CYP2D6 по 7 положению фенотиазинового фрагмента молекулы [194] (рисунок 10).

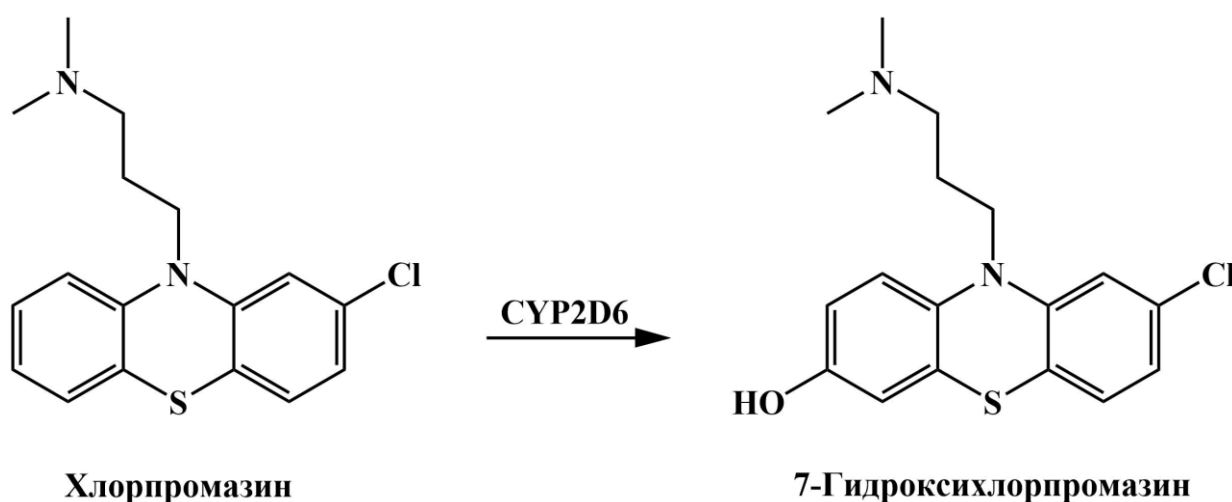


Рисунок 10. Реакция метаболизма хлорпромазина при участии CYP2D6.

Электрохимические свойства хлорпромазина, 7-гидроксихлорпромазина, а также 7,8-дигидроксихлорпромазина были исследованы в работе McCreery с помощью угольно-пастового электрода в цитрат-фосфатном буфере [195]. Автор показал различия в электрохимическом окислении хлорпромазина и его производных и предположил вероятные механизмы электрохимического окисления 7-гидроксихлорпромазина и 7,8-дигидроксихлорпромазина. В последующих исследованиях механизма электрохимического окисления 7-гидроксихлорпромазина Neptune и McCreery выявили образование различных интермедиатов, свидетельствующих о протекании реакции через формирование

имина, который может подвергаться как гидролизу, так и гидроксилированию [196]. Можно предположить, что количественное определение 7-гидроксихлорпромазина, основанное на отличии его электрохимических свойств от электрохимических свойств хлорпромазина, обусловленном наличием гидроксильной группы в 7 положении, может быть использовано для оценки влияния других лекарственных препаратов на активность CYP2D6.

Препарат пропранолол, принадлежащий к группе β -блокаторов, метаболизируется под действием CYP2D6 до 4'- или 5'-гидроксипропранолола [197] (рисунок 11).

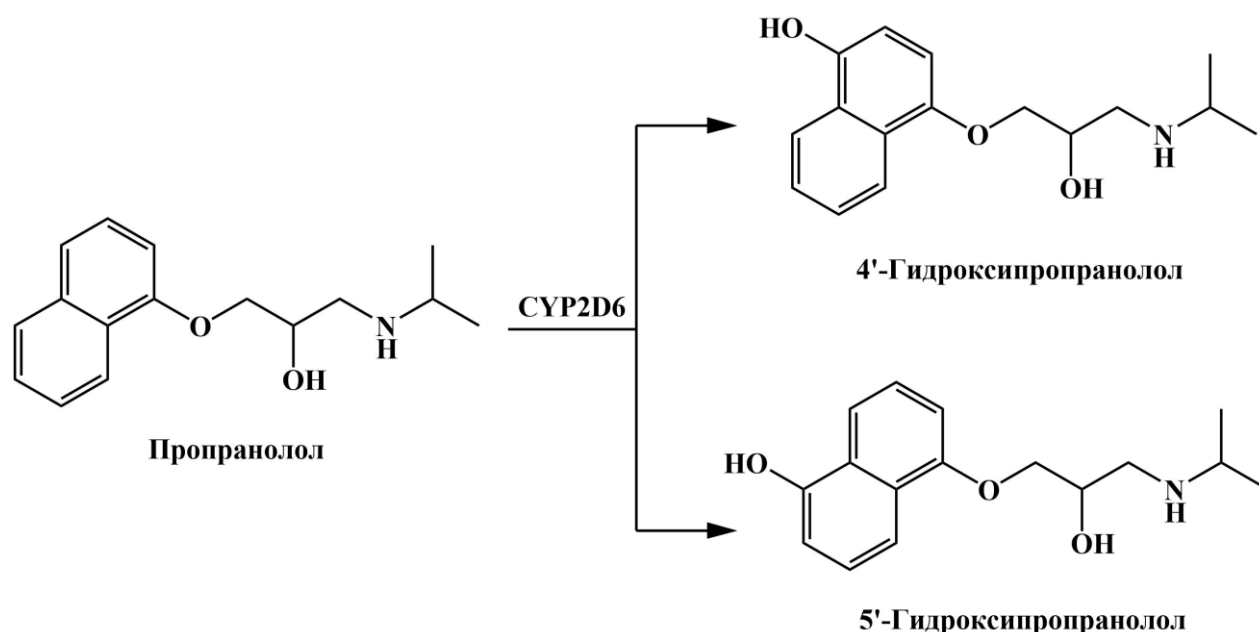


Рисунок 11. Реакции метаболизма пропранолола при участии CYP2D6.

Электрохимические свойства пропранолола и 4'-гидроксипропранолола были исследованы с помощью СУЭ в работе Baranowska и Koper [198]. В буфере Бриттона-Робинсона при pH 3 авторы зарегистрировали на циклической вольтамперограмме окислительный пик пропранолола в области 1,1-1,4 В (отн. Ag/AgCl), предполагая, что электрохимический процесс связан с окислением вторичной спиртовой группы, сопряженным с отщеплением двух электронов и двух протонов. Однако в других работах также предполагается, что электрохимический процесс для пропранолола может быть связан и с окислением

вторичной аминогруппы [199-201]. Для 4'-гидроксипропранолола первый пик окисления находился при 0,114 В, а на катодной ветви наблюдался восстановительный пик при 0,048 В. В электрохимическом процессе для 4'-гидроксипропранолола участвует гидроксифенильная группа, обратимо окисляющаяся до хинонового производного. Второй пик окисления для 4'-гидроксипропранолола при данных условиях был зарегистрирован при 0,4 В. Основываясь на различиях в электрохимических свойствах, авторы также продемонстрировали возможность одновременного электрохимического определения пропранолола, 4'-гидроксипропранолола и образующегося в организме в результате II фазы метаболизма 4'-гидроксипропранолола сульфата. Одновременное определение пропранолола и его 4'-гидроксиметаболита может быть использовано при оценке активности CYP2D6 в модельных системах.

1.6.2. Электрохимическое определение продуктов реакций О-деалкилирования

Реакции О-деалкилирования ароматических субстратов, катализируемые цитохромами Р450, приводят к образованию соответствующих гидроксифенильных производных и альдегидов.

Анальгетик и антипиретик фенацетин подвергается реакции О-деалкилирования при участии CYP1A2 с образованием О-деэтилфенацетина (ацетаминофена или парацетамола) [202] (рисунок 12).

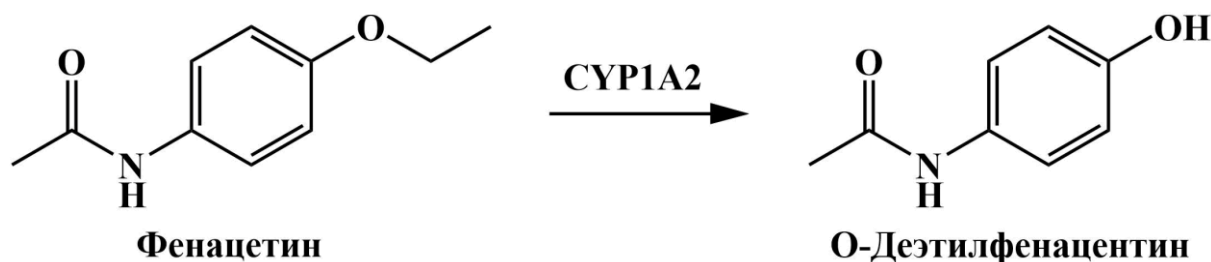


Рисунок 12. Реакция метаболизма фенацетина при участии CYP1A2.

По данным Yin и соавт., О-деэтилфенацетин окисляется при меньших потенциалах (пик окисления 0,42 В (отн. НКЭ)), по сравнению с фенацетином (пик окисления 0,848 В), а также авторы показали возможность совместного определения этих соединений благодаря различиям в их электрохимических свойствах [203]. Эта работа позволяет предположить, что оценка активности CYP1A2 по отношению к фенацетину может проводиться путем количественного электрохимического определения продукта О-деалкилирования фенацетина по его характеристическому пику окисления.

CYP2D6 принадлежит важная роль в метаболизме опиоидов [204]. Опиодный наркотический анальгетик кодеин подвергается реакции О-деметилования с образованием морфина, содержащего гидроксифенильную группу в 3 положении [205] (рисунок 13).

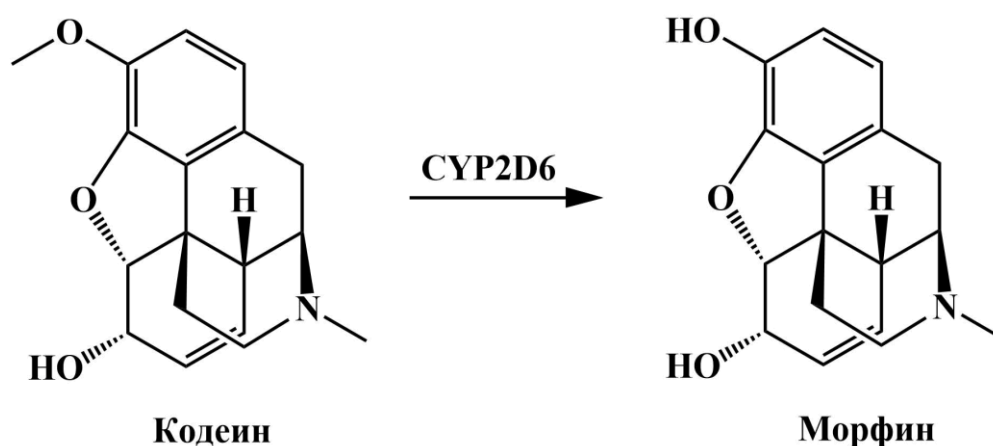


Рисунок 13. Реакция метаболизма кодеина при участии CYP2D6.

В работе Wester и соавт. показано, что в отличие от кодеина, морфин имеет четкий пик окисления в области 0,4 В (отн. Ag/AgCl), обусловленный наличием гидроксильной группы в 3 положении [206].

Трамадол подвергается CYP2D6-зависимому О-деметилованию с образованием О-десметилтрамадола [207] (рисунок 14).

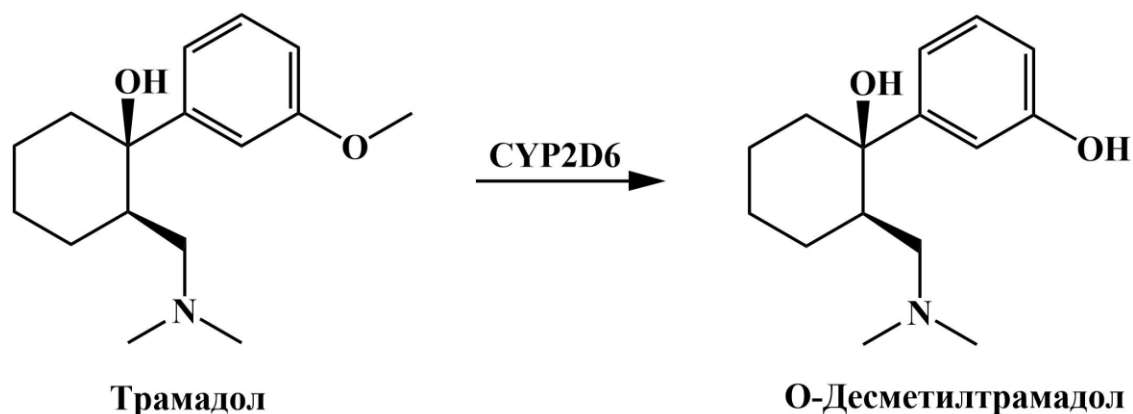


Рисунок 14. Реакция метаболизма трамадола при участии CYP2D6.

Возможность одновременного электрохимического определения трамадола и О-десметилтрамадола была показана в работе Mynttinen и соавт. [208]. Используя покрытые нафием электроды из тетраэдрического аморфного углерода, авторы показали, что трамадол и О-десметилтрамадол подвергаются электрохимическому окислению при различных потенциалах – 1,5 В и 0,95 В (отн. Ag/AgCl), соответственно. Различия в потенциалах окисления могут быть объяснены наличием гидроксильной группы у О-десметилтрамадола.

Таким образом, О-деметилазная активность CYP2D6 может оцениваться путем электрохимического определения морфина, в случае использования в качестве субстрата кодеина, или О-десметилтрамадола при использовании в качестве субстрата трамадола.

Из вышеперечисленных работ следует, что электрохимические свойства ряда лекарственных соединений и их метаболитов существенно различаются, что может быть использовано для количественного электрохимического определения последних как в биологических образцах (кровь или моча), так и в цитохром Р450-содержащих системах с целью оценки фармакокинетики лекарственных соединений и прогноза межлекарственных взаимодействий. При этом, в случае использования системы, в которой цитохром Р450 находится в иммобилизованном состоянии, не требуются дополнительные стадии очистки инкубационной смеси от белковых компонентов. Таким условиям удовлетворяют электрохимические

системы для определения активности цитохрома P450, в которых фермент находится в иммобилизованном на электроде состоянии.

В заключении данной главы можно отметить, что на сегодняшний день разработано большое количество электрохимических систем для определения активности иммобилизованных на электроде как рекомбинантных так и мембраносвязанных цитохромов P450. Также достигнуты успехи в разработке методик химической модификации электродов для иммобилизации цитохромов P450, позволяющих сохранить каталитическую активность ферментов. Проведены фундаментальные исследования, проливающие свет на механизмы цитохром P450-зависимых электрокаталитических реакций, протекающих в электрохимических системах. Электрохимические системы удобны для практического использования при решении задач фармакологии, связанных с определением активности цитохромов P450. Определение кинетических параметров цитохромов P450 в электрохимической системе может осуществляться путем регистрации каталитического тока, возникающего при внесении в систему субстрата, однако учитывая особенности каталитического цикла этих ферментов, для точного определения кинетических параметров необходимым является мониторинг образования продуктов реакций. Золотым стандартом количественного определения метаболитов цитохром P450-зависимых реакций, протекающих как в электрохимических, так и в альтернативных системах, является хромато-масс-спектрометрический анализ, однако его применение ограничивает высокопроизводительные исследования. Актуальной является разработка подходов идентификации и количественного определения метаболитов цитохром P450-зависимых реакций, основанных на применении электрохимических методов. Метаболиты с гидроксильными группами в ароматическом кольце, образующиеся в результате цитохром P450-зависимых реакций ароматического гидроксирования, деалкилирования ароматических соединений, ароматизации

стероидов, могут подвергаться прямому электрохимическому окислению, что может быть использовано для их количественного определения. При условии неперекрывающихся потенциалов электрохимического окисления не требуются дополнительные стадии разделения субстратов, продуктов и ингибиторов в случае проведения ингибиторного анализа. Совмещение электрохимических систем на основе иммобилизованных на электроде клинически значимых рекомбинантных или мембраносвязанных цитохромов P450 с электрохимическим количественным определением образующихся метаболитов лекарственных соединений с помощью измерительных электродов является весьма перспективным для практического использования при решении задач фармакокинетики, таких как ингибиторный анализ с целью выявления возможных межлекарственных взаимодействий. Повышение чувствительности электрохимического определения метаболитов с помощью современных материалов для модификации электродов, в том числе на основе углерода, а также создание устройств, позволяющих в автоматическом режиме проводить регистрацию образующихся продуктов, является перспективой дальнейшего развития электрохимических методов определения активности цитохромов P450.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Реактивы

Андростендион (99,6%), (S)-варфарин ($\geq 97\%$), гидрокортизон ($\geq 98\%$), дидодецилдиметиламмония бромид (98%), диклофенака натриевая соль ($\geq 98\%$), калий фосфорнокислый однозамещенный ($\geq 99\%$), калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный ($\geq 99\%$), кетоконазол ($\geq 99\%$), метанол (99,9%), (S)-напроксен ($\geq 98\%$), (S)-О-десметилнапроксен ($\geq 98\%$), сульфафеназол ($\geq 98\%$), фенитоин ($\geq 99\%$), хлорзоксазон ($\geq 98\%$), экзестан ($>98\%$), эстрон ($>99\%$), β -эстрадиол (98%), 4'-гидроксидиклофенак ($\geq 98,5\%$), 4-гидроксифенитоин (98%), 6-гидроксихлорзоксазон ($\geq 98\%$), 6 β -гидроксикортизол ($\geq 98\%$), (S)-7-гидроксиварфарин ($\geq 97\%$) были получены от Sigma-Aldrich, США. Гидроксид калия ($\geq 99\%$) был получен от «Компонент-реактив» (Россия). Дихлорметан (химически чистый, стабилизированный 0,08% масс. этанола) и петролейный эфир (температура кипения 50-70°C) были получены от ЭКОС-1, Россия. Натрий хлористый (99,5%), тестостерон (99%) и хлороформ (99%) были получены от Acros Organics, США. Серная кислота (95-98%) была получена от Fisher Scientific, Англия. Этилацетат (для ВЭЖХ анализа) был получен от Scharlau, Испания. В работе был использован 96% этанол. Водная дисперсия 0,2% ОУНТ, диаметр 1,6 $\pm$ 0,4 нм, длина > 5 мкм, площадь поверхности 1000 м²/г, стабилизированная карбоксиметилцеллюлозой, была получена от OCSIAL (<https://ocsial.com>).

Флуконазол был выделен из препарата «Флуконазол Тева» (Teva Pharmaceutical Works, Венгрия) путем флэш хроматографии с последующей тонкослойной хроматографией. Содержимое капсулы было растворено в этаноле и нанесено на стеклянную колонку, заполненную силикагелем (0,035-0,070 мм, Acros Organics). В качестве элюента была использована смесь этилацетат:этанол (7:3 по объему). Элюция флуконазола с колонки контролировалась с помощью тонкослойной хроматографии. В качестве неподвижной фазы использовались алюминиевые пластины с нанесенным на их поверхность силикагелем с

флуоресцентным индикатором F254 (TLC Silica gel 60 F254, Merck), а в качестве подвижной фазы использовалась смесь этилацетат:этанол (7:3 по объему). Полученные в результате флэш хроматографии фракции, содержащие флуконазол, были объединены и упарены под вакуумом. Полученный в результате упаривания осадок был растворен в 100 мкл этанола и полученный раствор был хроматографирован тонкослойной хроматографией. После хроматографического разделения пятно, соответствующее флуконазолу, изолировалось и элюировалось с пластины 10 мл этанола. Частицы силикагеля отделялись фильтрацией под вакуумом. Полученный фильтрат упаривался и полученный сухой остаток флуконазола переносился в вials. Полученный флуконазол был охарактеризован спектрофотометрически по пику поглощения в диапазоне 200-300 нм [209].

2.2. Препараты ферментов

В работе использовались рекомбинантный CYP19A1 человека (45 мкМ в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 20% (по объему) глицерин, 300 мМ NaCl и 0,2% (по объему) CHAPS), полученный как описано ранее [210], рекомбинантный CYP2C9 человека (255 мкМ или 263 мкМ в 600 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 20% (по объему) глицерин, 5 мМ β -меркаптоэтанол и 0,3% (по объему) CHAPS), полученный как описано ранее [211], рекомбинантный CYP2E1 человека (72 мкМ в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 20% (по объему) глицерин, 400 мМ NaCl и 1 мМ ЭДТА), полученный как описано ранее [212], рекомбинантный CYP3A4 человека (131 мкМ в 550 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,2), содержащем 20% (по объему) глицерин, 1 мМ дитиотреитол и 0,2% (по объему) CHAPS), полученный как описано ранее [213], рекомбинантный CYP2C19 человека (143,5 мкМ в 600 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 20% (по объему) глицерин и 0,3% (по объему) CHAPS), полученный как описано ранее [214], рекомбинантный микросомальный цит b_5 человека (158 мкМ в 400 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 20% (по объему) глицерин и 0,2% (по объему) холат натрия),

полученный как описано ранее [215], рекомбинантная CPR крысы (165,9 мкМ в 50 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,5), содержащем 20% (по объему) глицерин, 0,5 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотреитол), полученная как описано ранее [216].

Концентрации соответствующих цитохромов P450 в препаратах были определены спектрофотометрически по образованию комплекса восстановленной формы иона железа гема ферментов с монооксидом углерода, используя коэффициент поглощения $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [217]. Концентрация cyt b_5 определялась спектрофотометрически по образованию комплекса восстановленной формы иона железа гема с монооксидом углерода, используя коэффициент поглощения $\epsilon_{429-409} = 185 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [217]. Для каждого изофермента цитохрома P450 были охарактеризованы спектральные свойства и их изменения при взаимодействии соответствующих изоферментов с их специфическими лигандами. Все ферменты были получены в Институте биоорганической химии НАН Беларуси и предоставлены для исследования. Чистота всех используемых в работе белков составляла не менее 95%, по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Бактосомы с концентрацией белка 17,5 мг/мл, содержащие 4,3 мкМ CYP2E1 и CPR, коэкспрессированные в *Escherichia coli* и обогащенные 21,4 мкМ cyt b_5 человека, были получены от Сурех, Великобритания. Цитохром с редуктазная активность бактосом 673 нмоль/мин/мг белка. Максимальная скорость реакции ($V_{\max}$) 6-гидроксилирования хлорзоксазона – $9,3 \text{ мин}^{-1}$, K_M – 75 мкМ, в соответствии с информационным листом, поставляемым с бактосомами. Каталаза (2000-5000 Ед/мг белка) была получена от Sigma-Aldrich, США.

2.3. Электроды

В работе использовались следующие типы трехконтактных печатных электродов:

1) с графитовыми рабочим (диаметр 2 мм) и вспомогательным электродами и хлоридсеребряным (Ag/AgCl) электродом сравнения, полученные от «КолорЭлектроникс», Россия;

2) с графитовыми рабочим (диаметр 4 мм) и вспомогательным электродами и серебряным (Ag) электродом сравнения, полученные от Metrohm DropSens, Испания (каталожный номер 110);

3) с графитовыми рабочим (диаметр 4 мм) и вспомогательным электродами и Ag/AgCl электродом сравнения, полученные от Poten, Китай.

2.4. Оборудование

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

Навески химических веществ взвешивались с помощью аналитических весов OHAUS Pioneer PA214C (США) с дискретностью измерения 0,0001 г.

Измерение pH буферных растворов проводилось с помощью pH-метра/иономера S220 Mettler Toledo, США с дискретностью измерения 0,01.

2.5. Методики исследования

2.5.1. Химическая модификация электродов и иммобилизация цитохромов P450, cyt b_5 , CPR или бактосом

Поверхности рабочих электродов были покрыты 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 раствора ДДАБ в хлороформе. Электроды оставляли при комнатной температуре на 10 мин для испарения хлороформа. Далее, 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 b_5 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 b_5 , или 1,5 мкл бактосом, компонентный состав которых указан выше.

Модифицированные электроды с иммобилизованными белками или бактосомами оставляли на 10 мин при комнатной температуре в чашке Петри и далее помещали в холодильник на +4°C до использования (не позднее следующего дня).

2.5.2. Исследование электрохимических свойств цитохромов P450, cyt b_5 , CPR и бактосом в анаэробных условиях

Электрохимические параметры иммобилизованных на поверхности химически модифицированных электродов белков или бактосом определяли в анаэробных условиях. Электроды помещали в проточную пластиковую ячейку («Русенс», Россия) с входным и выходным каналами. Ячейка заполнялась 1 мл 100

мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, и герметично закрывалась. Через входной канал подавался аргон (99,993%, получен от Линде Газ Рус (Россия)) в течение примерно 30 мин. Выходной канал был соединен с силиконовой трубкой, другой конец которой опущен в колбу с дистиллированной водой для отвода из ячейки выходящего газа. Насыщение буфера аргоном контролировалось методом циклической вольтамперометрии. О достаточной насыщенности буфера аргоном свидетельствовало наличие относительно симметричных пиков восстановления и окисления иона железа гема иммобилизованных цитохромов P450. Циклические вольтамперограммы регистрировались при скоростях сканирования от 10 до 100 мВ/с в диапазоне от 0 до -0,7 В (отн. Ag/AgCl) для CYP19A1, от 0 до -0,65 В (отн. Ag/AgCl или отн. Ag) для CYP2C9, от 0,1 до -0,7 В (отн. Ag) для CYP2C19, от 0,1 до -0,75 В (отн. Ag/AgCl) для CYP2E1-содержащих бактосом, CYP2E1, cyt b_5 и CPR и от 0 до -0,6 В (отн. Ag/AgCl) для CYP3A4.

Значения E_m для исследуемых белков и бактосом были рассчитаны по уравнению 3.

Количество электроактивного цитохрома P450 на поверхности электрода было рассчитано в соответствии с уравнением 10.

Значения гетерогенных констант скорости переноса электронов между электродом и ионом железа гема рассчитывались по методу Лавирона [218].

Для исследования электрохимических свойств бактосом и CPR в анаэробных условиях также использовался метод дифференциально-импульсной вольтамперометрии. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы регистрировались в диапазоне потенциалов от -0,75 до 0,1 В (отн. Ag/AgCl) при амплитуде модуляции 20 мВ, шаге потенциала 5 мВ, времени модуляции 50 мс и времени интервала 500 мс.

Электрохимические исследования в анаэробных условиях проводили при комнатной температуре ($23 \pm 2^\circ\text{C}$).

2.5.3. Электрохимическое определение субстратов и метаболитов цитохром Р450-зависимых реакций

2.5.3.1. Электрохимическое определение андростендиона, тестостерона, эстрогена и β -эстрадиола

Исследование электрохимических свойств андростендиона, тестостерона, эстрогена и β -эстрадиола проводилось методом циклической вольтамперометрии. Для этого на поверхность немодифицированного печатного электрода («КолорЭлектроникс») наносили 60 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и исследуемое соединение (андростендион, тестостерон, эстрон и β -эстрадиол) в соответствующих концентрациях, и регистрировали циклические вольтамперограммы в диапазоне потенциалов от 0 до 1,2 В (отн. Ag/AgCl) при скорости сканирования 100 мВ/с. Количественное определение эстрогена или β -эстрадиола проводилось методом квадратно-волновой вольтамперометрии с помощью электродов «КолорЭлектроникс». Для построения калибровочных зависимостей тока пика окисления при $0,497 \pm 0,014$ В (отн. Ag/AgCl) от концентрации эстрогена и тока пика окисления в области $0,483 \pm 0,017$ В (отн. Ag/AgCl) от концентрации β -эстрадиола 60 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол, эстрон или β -эстрадиол в диапазоне концентраций 0,05-2,5 мкМ, наносили на поверхность немодифицированного печатного электрода в горизонтальном режиме, после чего регистрировались квадратно-волновые вольтамперограммы в диапазоне от 0 до 1 В (отн. Ag/AgCl) при частоте 25 Гц, амплитуде 40 мВ и шаге потенциала 5 мВ.

2.5.3.2. Электрохимическое определение (S)-варфарина и (S)-7-гидроксиварфарина

Исследование электрохимических свойств (S)-варфарина и (S)-7-гидроксиварфарина проводилось методом циклической вольтамперометрии. Для этого на поверхность немодифицированного печатного электрода («КолорЭлектроникс») наносили 60 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и исследуемое соединение или смесь соединений ((S)-варфарин и (S)-7-гидроксиварфарин) в соответствующих концентрациях, и регистрировали циклические вольтамперограммы в диапазоне потенциалов от 0 до 1,2 В (отн. Ag/AgCl) при скорости сканирования 100 мВ/с. Количественное определение (S)-7-гидроксиварфарина проводилось методом квадратно-волновой вольтамперометрии с помощью электродов «КолорЭлектроникс». Для построения калибровочной зависимости тока пика окисления в области $0,590 \pm 0,020$ В (отн. Ag/AgCl) от концентрации (S)-7-гидроксиварфарина 60 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и (S)-7-гидроксиварфарин в диапазоне концентраций 0-1 мкМ, наносили на поверхность немодифицированного печатного электрода в горизонтальном режиме, после чего регистрировались квадратно-волновые вольтамперограммы в диапазоне от 0,4 до 0,8 В (отн. Ag/AgCl) при частоте 25 Гц, амплитуде 40 мВ и шаге потенциала 5 мВ.

2.5.3.3. Электрохимическое определение диклофенака и 4'-гидроксидиклофенака

Исследование электрохимических свойств диклофенака и 4'-гидроксидиклофенака проводилось методом циклической вольтамперометрии. Для этого на поверхность немодифицированного печатного электрода («КолорЭлектроникс») наносили 60 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН

7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и исследуемое соединение или смесь соединений (диклофенак и 4'-гидроксидиклофенак) в соответствующих концентрациях, и регистрировали циклические вольтамперограммы в диапазоне потенциалов от -0,7 до 1,2 В (отн. Ag/AgCl) при скорости сканирования 100 мВ/с. Количественное определение 4'-гидроксидиклофенака проводилось методом квадратно-волновой вольтамперометрии с помощью электродов «КолорЭлектроникс», модифицированных 1 мкл разведенной в 10 раз дистиллированной водой дисперсии ОУНТ. Для построения калибровочной зависимости тока пика окисления в области $0,110 \pm 0,010$ В (отн. Ag/AgCl) от концентрации 4'-гидроксидиклофенака 60 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 4'-гидроксидиклофенак в диапазоне концентраций 0-1 мкМ, наносили на поверхность модифицированного печатного электрода в горизонтальном режиме, после чего регистрировались квадратно-волновые вольтамперограммы в диапазоне от 0 до 1,2 В (отн. Ag/AgCl) при частоте 25 Гц, амплитуде 40 мВ и шаге потенциала 5 мВ.

2.5.3.4. Электрохимическое определение (S)-напроксена и (S)-О-десметилнапроксена

Исследование электрохимических свойств (S)-напроксена и (S)-О-десметилнапроксена проводилось методом циклической вольтамперометрии. Для этого на поверхность немодифицированных электродов (Metrohm DropSens) наносили 60 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и исследуемое соединение или смесь соединений ((S)-напроксен и (S)-О-десметилнапроксен) в соответствующих концентрациях, и регистрировали циклические вольтамперограммы в диапазоне потенциалов от 0 до 1,2 В (отн. Ag) при скорости сканирования 100 мВ/с. Количественное определение (S)-О-десметилнапроксена проводилось методом квадратно-волновой вольтамперометрии с помощью электродов DropSens. Для построения калибровочной зависимости тока пика окисления в области $0,4 \pm 0,02$ В (отн. Ag)

от концентрации (S)-О-десметилнапроксена 60 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и (S)-О-десметилнапроксен в диапазоне концентраций 0-1 мкМ, наносили на поверхность немодифицированного печатного электрода в горизонтальном режиме, после чего регистрировались квадратно-волновые вольтамперограммы в диапазоне от 0 до 1,2 В (отн. Ag) при частоте 25 Гц, амплитуде 40 мВ и шаге потенциала 5 мВ.

2.5.3.5. Электрохимическое определение фенитоина и 4-гидроксифенитоина

Исследование электрохимических свойств фенитоина и 4-гидроксифенитоина проводилось методом циклической вольтамперометрии. Для этого на поверхность немодифицированных электродов (Metrohm DropSens) наносили 60 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и исследуемое соединение или смесь соединений (фенитоин и 4-гидроксифенитоин) в соответствующих концентрациях, и регистрировали циклические вольтамперограммы в диапазоне потенциалов от 0 до 1,2 В (отн. Ag) при скорости сканирования 100 мВ/с. Количественное определение 4-гидроксифенитоина проводилось методом квадратно-волновой вольтамперометрии с помощью электродов DropSens. Для построения калибровочной зависимости тока пика окисления в области $0,602 \pm 0,018$ В (отн. Ag) от концентрации 4-гидроксифенитоина 60 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 4-гидроксифенитоин в диапазоне концентраций 0-1 мкМ, наносили на поверхность немодифицированного печатного электрода в горизонтальном режиме, после чего регистрировались квадратно-волновые вольтамперограммы в диапазоне от 0,3 до 0,9 В (отн. Ag) при частоте 25 Гц, амплитуде 40 мВ и шаге потенциала 5 мВ.

2.5.3.6. Электрохимическое определение хлорзоксазона и 6-гидроксихлорзоксазона

Исследование электрохимических свойств хлорзоксазона и 6-гидроксихлорзоксазона проводилось методом циклической вольтамперометрии. Для этого на поверхность немодифицированных электродов («КолорЭлектроникс») наносили 60 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl и исследуемое соединение или смесь соединений (хлорзоксазон и 6-гидроксихлорзоксазон) в соответствующих концентрациях, и регистрировали циклические вольтамперограммы в диапазоне потенциалов от 0 до 1,2 В (отн. Ag/AgCl) при скорости сканирования 100 мВ/с. Для приготовления стоковых растворов хлорзоксазона и 6-гидроксихлорзоксазона навески соответствующих соединений растворялись в 60 мМ гидроксиде калия, приготовленного непосредственно перед экспериментами. Количественное определение 6-гидроксихлорзоксазона проводилось методом квадратно-волновой вольтамперометрии с помощью электродов («КолорЭлектроникс»). Для построения калибровочной зависимости тока пика окисления в области $0,203 \pm 0,022$ В (отн. Ag/AgCl) от концентрации 6-гидроксихлорзоксазона 60 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl и 6-гидроксихлорзоксазон в диапазоне концентраций 0-1 мкМ, наносили на поверхность немодифицированного печатного электрода в горизонтальном режиме, после чего регистрировались квадратно-волновые вольтамперограммы в диапазоне от 0 до 1,2 В (отн. Ag/AgCl) при частоте 25 Гц, амплитуде 40 мВ и шаге потенциала 5 мВ.

2.5.4. Определение гидрокортизона и 6β-гидрокортизола методом флуоресцентной спектроскопии

Флуоресцентные свойства гидрокортизона и 6β-гидрокортизола после их обработки смесью серной кислоты и этанола исследовались методом

флуоресцентной спектроскопии. Для дериватизации гидрокортизона и 6 β -гидроксикортизола к 300 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и исследуемое соединение или смесь соединений (гидрокортизон и 6 β -гидроксикортизол) в соответствующих концентрациях, добавляли 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 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 6 β -гидроксикортизола к 300 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 6 β -гидроксикортизол в диапазоне концентраций 0-10 мкМ, добавляли 600 мкл смеси серной кислоты и этанола (3:1 по объему). Инкубация полученного раствора и регистрация спектра проводились при условиях, указанных выше.

2.5.5. Определение электрокаталитической активности цитохромов P450

2.5.5.1. Определение электрокаталитической активности CYP19A1

Электроды с иммобилизованным CYP19A1 помещались в пластиковую ячейку объемом 300 мкл, заполненную 100 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации андростендиона или тестостерона (от 0 до 20 мкМ). 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 фермент-зависимых электрокаталитических реакций 60 мкл реакционной смеси отбирались и наносились на поверхность немодифицированного печатного электрода («КолорЭлектроникс») с последующей регистрацией квадратно-волновых вольтамперограмм при условиях, описанных в 2.5.3.1. Концентрации образующихся эстрона или β -эстрадиола

определяли по уравнению калибровочной зависимости амплитуды тока окисления этих соединений от их концентрации в стандартных растворах. Начальные скорости электрокаталитических CYP19A1-зависимых реакций выражали как количество продукта (моль), образующегося за минуту, соотнесенное к количеству электроактивного CYP19A1 на электроде (моль), что соответствовало размерности, равной мин^{-1} .

Для исследования механизм-активируемого ингибирования CYP19A1 экземестаном ферментные электроды были проинкубированы в 60 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации экземестана (от 0 до 10000 нМ), прогретого до 37°C, в течение 5 мин. После инкубации проводились CYP19A1-зависимые электрокаталитические реакции по отношению к экземестану при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,6 В (отн. Ag/AgCl) в течение 2,5-10 мин и горизонтально расположенном электроде. После проведения электрокаталитических реакций смесь удалялась с поверхности электродов, и далее электроды помещались в пластиковую ячейку объемом 300 мкл, заполненную 100 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 10 мкМ андростендион. Далее CYP19A1-зависимые электрокаталитические реакции по отношению к андростендиону и определение начальных скоростей проводились как описано выше. Кинетические параметры, характеризующие механизм-активируемое ингибирование, – максимальное значение константы скорости инактивации (k_{inact}), время полуинактивации ($t_{1/2}$) и концентрация ингибитора, необходимая для инактивации фермента на 50% (K_I), – были рассчитаны из зависимостей значений наблюдаемой константы инактивации фермента (k_{obs}) от концентрации экземестана. Значения k_{obs} определялись из наклона зависимостей логарифма остаточной активности фермента (%) от времени проведения CYP19A1-зависимых электрокаталитических реакций.

2.5.5.2. Определение электрокаталитической активности CYP2C9 по отношению к (S)-варфарину

Электроды с иммобилизованным CYP2C9 помещались в пластиковую ячейку, заполненную 1 мл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации (S)-варфарина (от 0 до 50 мкМ). 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 фермент-зависимых электрокаталитических реакций 60 мкл реакционной смеси отбирались и наносились на поверхность немодифицированного печатного электрода («КолорЭлектроникс») с последующей регистрацией квадратно-волновых вольтамперограмм при условиях, описанных в 2.5.3.2. Концентрации образующегося (S)-гидроксиварфарина определяли по уравнению калибровочной зависимости амплитуды тока окисления этого соединения от его концентрации в стандартных растворах. Начальные скорости электрокаталитической CYP2C9-зависимой реакции выражали как количество продукта (моль), образующегося за минуту, соотнесенное к количеству электроактивного CYP2C9 на электроде (моль), что соответствовало размерности, равной мин⁻¹.

2.5.5.3. Определение электрокаталитической активности CYP2C9 по отношению к диклофенаку

Электроды с иммобилизованным CYP2C9 помещались в пластиковую ячейку, заполненную 300 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации диклофенака (от 0 до 100 мкМ). 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 фермент-зависимых электрокаталитических реакций 60 мкл

реакционной смеси отбирались и наносились на поверхность немодифицированного печатного электрода («КолорЭлектроникс») с последующей регистрацией квадратно-волновых вольтамперограмм при условиях, описанных в 2.5.3.3. Концентрации образующегося 4'-гидроксидиклофенака определяли по уравнению калибровочной зависимости амплитуды тока окисления этого соединения от его концентрации в стандартных растворах. Начальные скорости электрокаталитической CYP2C9-зависимой реакции выражали как количество продукта (моль), образующегося за минуту, соотнесенное к количеству электроактивного CYP2C9 на электроде (моль), что соответствовало размерности, равной мин⁻¹.

2.5.5.4. Определение электрокаталитической активности CYP2C9 по отношению к (S)-напроксену

Электроды с иммобилизованным CYP2C9 помещались в пластиковую ячейку, заполненную 900 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации (S)-напроксена (от 0 до 1500 мкМ). CYP2C9-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 фермент-зависимых электрокаталитических реакций 60 мкл реакционной смеси отбирались и наносились на поверхность немодифицированного печатного электрода (Metrohm DropSens) с последующей регистрацией квадратно-волновых вольтамперограмм при условиях, описанных в 2.5.3.4. Концентрации образующегося (S)-О-десметилнапроксена определяли по уравнению калибровочной зависимости амплитуды тока окисления этого соединения от его концентрации в стандартных растворах. Начальные скорости электрокаталитической CYP2C9-зависимой реакции выражали как количество продукта (моль), образующегося за минуту, соотнесенное к количеству

электроактивного CYP2C9 на электроде (моль), что соответствовало размерности, равной мин^{-1} .

2.5.5.5. Определение электрокаталитической активности CYP2C19 по отношению к фенитоину

Электроды с иммобилизованным CYP2C19 помещались в пластиковую ячейку, заполненную 900 мкл 100 mM калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 mM NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации фенитоина (от 0 до 300 мкМ). CYP2C19-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 фермент-зависимых электрокаталитических реакций 60 мкл реакционной смеси отбирались и наносились на поверхность немодифицированного печатного электрода (Metrohm DropSens) с последующей регистрацией квадратно-волновых вольтамперограмм при условиях, описанных в 2.5.3.5. Концентрации образующегося 4-гидроксифенитоина определяли по уравнению калибровочной зависимости амплитуды тока окисления этого соединения от его концентрации в стандартных растворах. Начальные скорости электрокаталитической CYP2C19-зависимой реакции выражали как количество продукта (моль), образующегося за минуту, соотнесенное к количеству электроактивного CYP2C19 на электроде (моль), что соответствовало размерности, равной мин^{-1} .

2.5.5.6. Определение электрокаталитической активности CYP2E1-содержащих бактосом по отношению к хлорзоксазону

Электроды с иммобилизованными бактосомами помещались в пластиковую ячейку, заполненную 900 мкл 100 mM калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 mM NaCl и различные концентрации хлорзоксазона (от 0 до 500

мкМ). CYP2E1-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 фермент-зависимых электрокаталитических реакций 60 мкл реакционной смеси отбирались и наносились на поверхность немодифицированного печатного электрода («КолорЭлектроникс») с последующей регистрацией квадратно-волновых вольтамперограмм при условиях, описанных в 2.5.3.6. Концентрации образующегося 6-гидроксихлорзоксазона определяли по уравнению калибровочной зависимости амплитуды тока окисления этого соединения от его концентрации в стандартных растворах. Начальные скорости электрокаталитической CYP2E1-зависимой реакции выражали как количество продукта (моль), образующегося за минуту, соотнесенное к количеству электроактивного CYP2E1 на электроде (моль), что соответствовало размерности, равной мин⁻¹. При этом, количество электроактивного CYP2E1 было рассчитано в соответствии с уравнением 10 с учетом заявленного производителем молярного соотношения CYP2E1 и $\text{cyt } b_5$ в бактосомах.

Исследование электрокаталитической активности CYP2E1-содержащих бактосом по отношению к хлорзоксазону проводилось также путем определения образующегося 6-гидроксихлорзоксазона методом тонкослойной хроматографии и абсорбционной спектроскопии. После проведения электрокаталитической реакции в течение 90 мин 450 мкл инкубационной смеси переносились в пробирку и смешивались с 900 мкл дихлорметана с последующим центрифугированием в течение 5 мин при $12100 \times g$. После центрифугирования нижнюю (органическую) фазу переносили в другую пробирку, а к оставшейся верхней фазе снова добавляли 900 мкл дихлорметана с последующим центрифугированием при вышеуказанных условиях. После повторного центрифугирования нижнюю фазу объединяли с полученной на первом этапе центрифугирования органической фазой с последующим упариванием всего полученного объема при температуре 38°C под потоком аргона. Упаренные образцы растворялись в 20 мкл этанола и наносились на алюминиевые пластины для тонкослойной хроматографии с флуоресцентным

реагентом, покрытые силикагелем (TLC Silica gel 60, F254, Merck, Германия). В качестве контроля на пластины также наносились по 1 мкл 2,5-10 мМ хлорзоксазона и 6-гидроксихлорзоксазона в этаноле. Хроматография осуществлялась с помощью подвижной фазы, состоящей из смеси 1:1 (по объему) петролейного эфира и этилацетата, в стеклянной камере. После хроматографии пластины высушивали при комнатной температуре и далее для улучшения визуализации 6-гидроксихлорзоксазона пластины помещали в эксикатор, насыщенный парами йода, точно на 2 мин. Визуализация разделившихся соединений на хроматографической пластине осуществлялась с помощью ультрафиолетовой лампы (Vilber Lourmat, Франция) при длине волны 254 нм. Пятна на хроматографической пластине, соответствующие 6-гидроксихлорзоксазону в опытной и контрольной пробах, изолировали и далее элюировали 600 мкл этанола. Частицы силикагеля осаждали с помощью центрифугирования в течение 5 мин при $12100 \times g$. Спектр поглощения 6-гидроксихлорзоксазона в надосадочной жидкости регистрировали в кварцевых кюветах в области длин волн 230-350 нм. Концентрацию 6-гидроксихлорзоксазона определяли по калибровочной зависимости оптической плотности в максимуме поглощения 6-гидроксихлорзоксазона в области 280-300 нм от концентрации этого соединения в стандартных растворах 6-гидроксихлорзоксазона.

2.5.5.7. Определение электрокаталитической активности CYP3A4 по отношению к гидрокортизону

Электроды с иммобилизованным CYP3A4 помещались в пластиковую ячейку, заполненную 300 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации гидрокортизона (от 0 до 100 мкМ). CYP3A4-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 фермент-зависимых 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 при условиях, описанных в 2.5.4. Концентрацию образующегося 6 β -гидрокортизола определяли по уравнению калибровочной зависимости интенсивности пика эмиссии при λ_{em} 427 $\pm$ 2 нм от концентрации этого соединения в стандартных растворах. Начальные скорости электрокаталитической СУРЗА4-зависимой реакции выражали как количество продукта (моль), образующегося за минуту, соотнесенное к количеству электроактивного СУРЗА4 на электроде (моль), что соответствовало размерности, равной мин⁻¹.

2.5.6. Определение параметров стационарной кинетики биотрансформации исследуемых соединений при участии цитохромов Р450

Для определения параметров стационарной кинетики биотрансформации исследуемых соединений при участии цитохромов Р450 в случае гиперболической зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата проводилась аппроксимация экспериментальных данных в соответствии с уравнением Михаэлиса-Ментен (16):

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}, \quad (16)$$

где V – начальная скорость реакции биотрансформации субстрата, мин⁻¹, 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 (17):

$$V = \frac{V_{max1}[S]}{K_{M1} + [S]} + \frac{V_{max2}[S]}{K_{M2} + [S]}, \quad (17)$$

где V_{max1} – 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 .

Значения V определялись из отношений тангенсов углов наклонов начальных линейных участков зависимостей количеств образующихся продуктов от времени ферментативной реакции к количествам электроактивных ферментов на электроде, как описано в методиках п. 2.5.5.

2.5.7. 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 и их аппроксимации были получены с помощью программного обеспечения Origin 7.5 или 8.1.

Предел определяемых концентраций аналитов рассчитывался с учетом троекратного стандартного отклонения (3σ) средней величины фонового сигнала.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Разработка методологии биэлектродной электрохимической системы для определения активности цитохромов P450

В данной части работы мы разработали методологию биэлектродной электрохимической системы для определения активности ряда клинически значимых цитохромов P450. Мы предположили, что 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 сам фермент находится в иммобилизованном состоянии на электроде, и инициирование каталитической реакции осуществляется за счет электрохимического восстановления его иона железа гема. За счет способности образующихся продуктов ферментативных реакций окисляться при потенциалах, отличных от потенциалов окисления исходных субстратов, отсутствует необходимость разделения компонентов реакционной среды для количественного определения продуктов реакций.

3.1.1. Биэлектродная электрохимическая система для определения каталитической активности CYP19A1 по отношению к андрогенам

Основываясь на способности эстрогенов необратимо окисляться на твердотельных электродах при потенциале около 0,5 В (отн. Ag/AgCl) [219-221], 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 иона железа гема, при этом второй (немодифицированный) электрод использовался для количественного определения

образующихся в процессе ферментативной реакции эстрогенов путем их прямого электрохимического окисления. Принцип функционирования предложенной электрохимической системы для определения активности CYP19A1 представлен на рисунке 15.

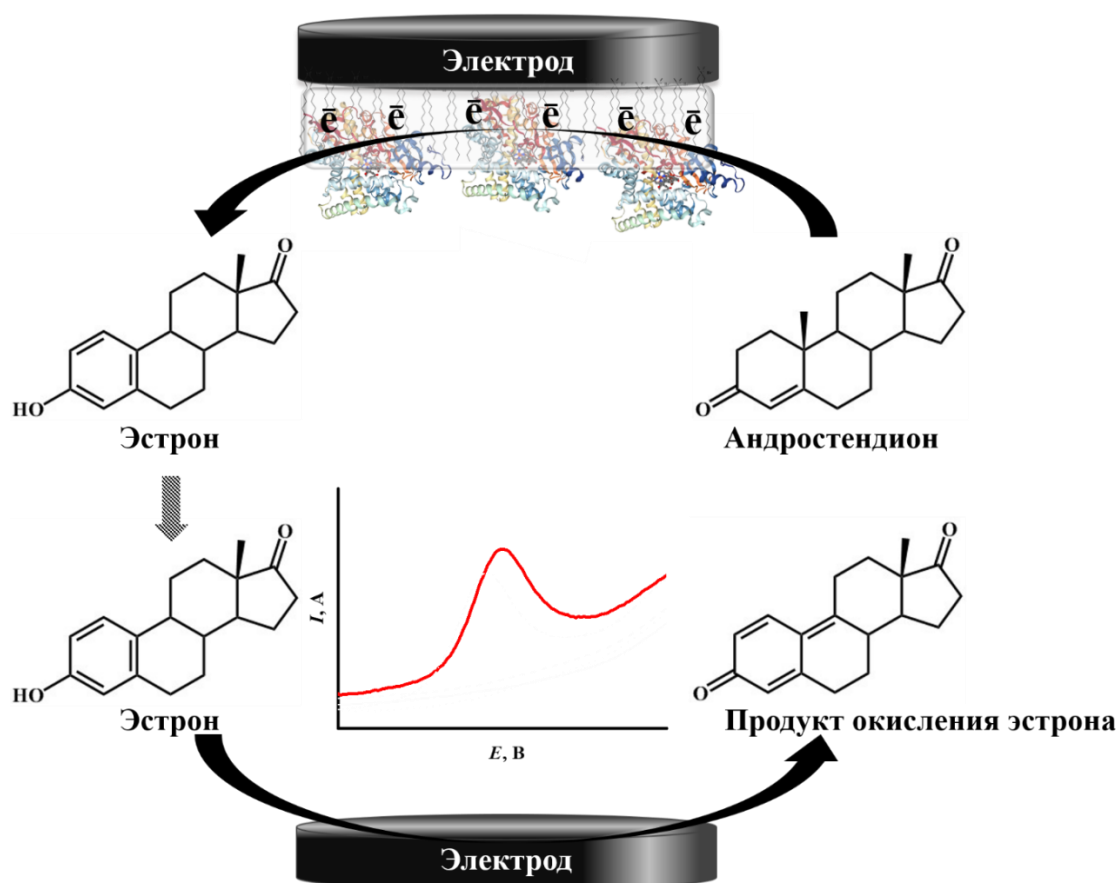


Рисунок 15. Принцип функционирования биэлектродной электрохимической системы для определения активности CYP19A1. Один из электродов (на рисунке сверху) модифицирован и служит для иммобилизации CYP19A1 и электрохимического восстановления иона железа гема фермента, второй электрод (на рисунке снизу) служит для регистрации образующегося из андростендиона в процессе ферментативной реакции эстрогена путем его прямого электрохимического окисления.

CYP19A1 катализирует последовательную трехстадийную реакцию биосинтеза эстрогенов (C18-стероидов) – эстрогена и β -эстрадиола – из андрогенов

(C19-стероидов) – андростендиона и тестостерона, соответственно (рисунок 16) [222].

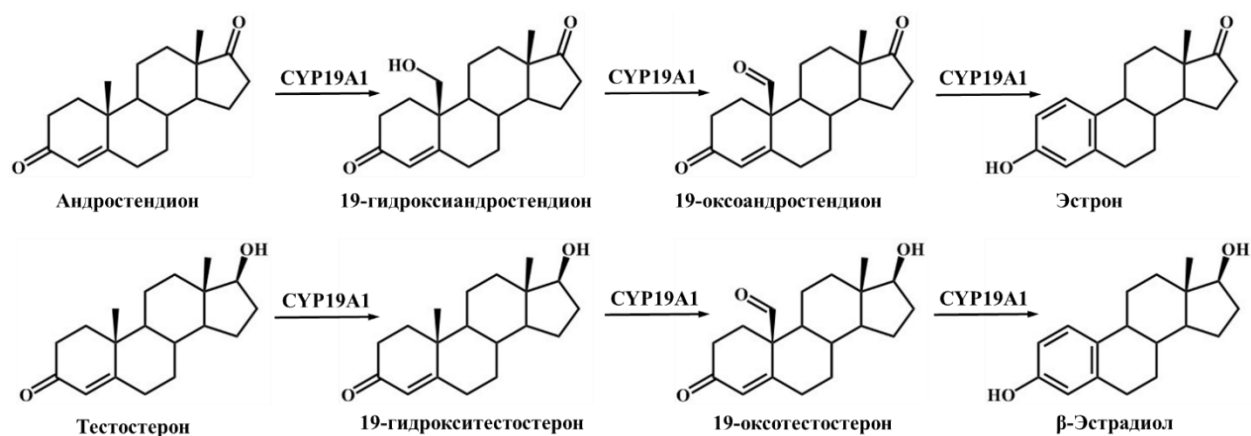


Рисунок 16. Реакции ароматизации андрогенов (андростендиона и тестостерона) при участии CYP19A1.

Ингибиторы CYP19A1 являются эффективными препаратами, применяющимися для лечения рака молочной железы [223]. Скрининг новых химических соединений с целью выявления эффективных ингибиторов CYP19A1 требует многоэтапного процесса определения активности этого фермента. Кроме того, в связи с очень низким значением K_M CYP19A1 по отношению к андростендиону ($0,044 \pm 0,006$ мкМ) и малым количеством образующегося продукта в реконструированной системе имеется необходимость использования радиоактивно меченых субстратов этого фермента [222]. Определение эстрогенов с помощью хромато-масс-спектрометрических методов является трудоемким процессом из-за физико-химических особенностей этих соединений, таких как низкая степень ионизации, что требует дополнительной стадии дериватизации и больших количеств образца [224].

Впервые электрохимическая система на основе иммобилизованного на СУЭ CYP19A1 была получена группой Gilardi [225]. С помощью определения продуктов реакций методом ВЭЖХ авторам удалось продемонстрировать электрокаталитическую активность CYP19A1 по отношению к андростендиону, однако образование эстрона удалось достоверно зафиксировать только при

использовании 19-гидроксиандростендиона или 19-оксоандростендиона в качестве исходных субстратов, вносимых в электрохимическую систему, поскольку лимитирующей стадией процесса ароматизации андростендиона в эстрон является гидроксилирование субстратов по 19 положению.

Процесс прямого переноса электронов между модифицированным электродом и ионом железа гема СУР19А1 был охарактеризован методом циклической вольтамперометрии в анаэробных условиях в насыщенном аргоне 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl (рисунок 17).

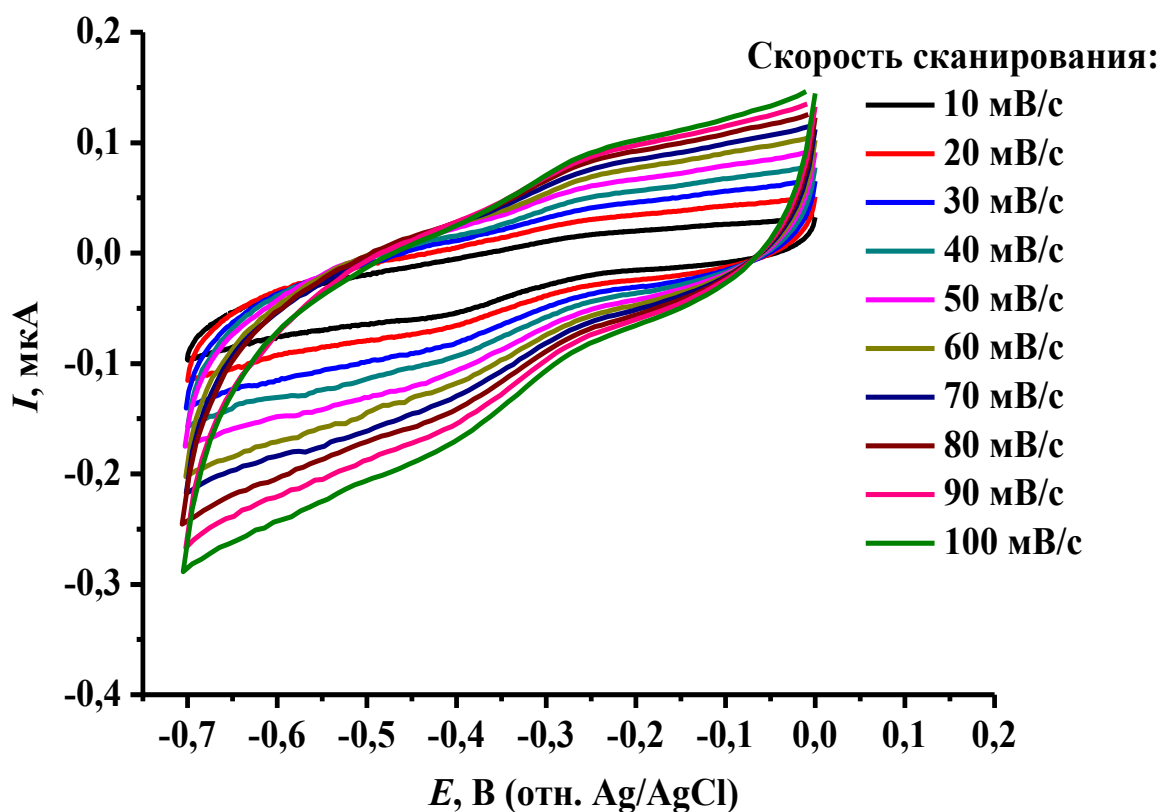


Рисунок 17. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ, с иммобилизованным СУР19А1 в насыщенном аргоне 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl. Скорость сканирования от 10 до 100 мВ/с.

Как видно на рисунке 17, циклические вольтамперограммы электрода, модифицированного ДДАБ, с иммобилизованным СУР19А1 характеризуются

наличием пиков восстановления и окисления иона железа гема. При скорости сканирования 100 мВ/с значения E_c и E_a пиков были определены как $-0,412 \pm 0,011$ В (отн. Ag/AgCl) и $-0,242 \pm 0,006$ В (отн. Ag/AgCl), соответственно. Значение E_m было рассчитано как $-0,327 \pm 0,017$ В (отн. Ag/AgCl). Разность между потенциалами катодного и анодного пиков (ΔE) рассчитана как 170 мВ. В соответствии с моделью Лавирона значение k_s при скорости сканирования 100 мВ/с и α 0,56 было определено как $0,6 \pm 0,1$ с⁻¹. Для дальнейшего определения каталитической активности CYP19A1 из циклических вольтамперограмм, зарегистрированных в анаэробных условиях, в соответствии с уравнением 10, было рассчитано количество электроактивного фермента на поверхности модифицированного электрода, которое составило $0,43 \pm 0,02$ пмоль.

С целью количественного определения продуктов CYP19A1-зависимой электрокаталитической реакции мы использовали свойство эстрона и β -эстрадиола электрохимически окисляться на электроде через последовательное образование соответствующих фенокси- и феноксониевых интермедиатов в соответствии с механизмом, предложенным ранее на примере β -эстрадиола [226]. Мы сравнили электрохимические свойства эстрона, β -эстрадиола и субстратов, из которых соответственно образуются данные соединения, – андростендиона и тестостерона. Как видно на рисунке 18, циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ, для 50 мкМ эстрона и 50 мкМ β -эстрадиола в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и 1% (по объему) метанол, имеют пики окисления при 0,546 В (отн. Ag/AgCl) и 0,517 В (отн. Ag/AgCl), соответственно, при этом андростендион и тестостерон не окисляются в данном диапазоне потенциалов. Таким образом, эстрогены могут быть определены за счет их прямого электрохимического окисления, при этом в случае проведения ферментативного анализа отсутствует необходимость разделения инкубационной смеси, содержащей одновременно как эстрогены (продукты), так и андрогены (субстраты).

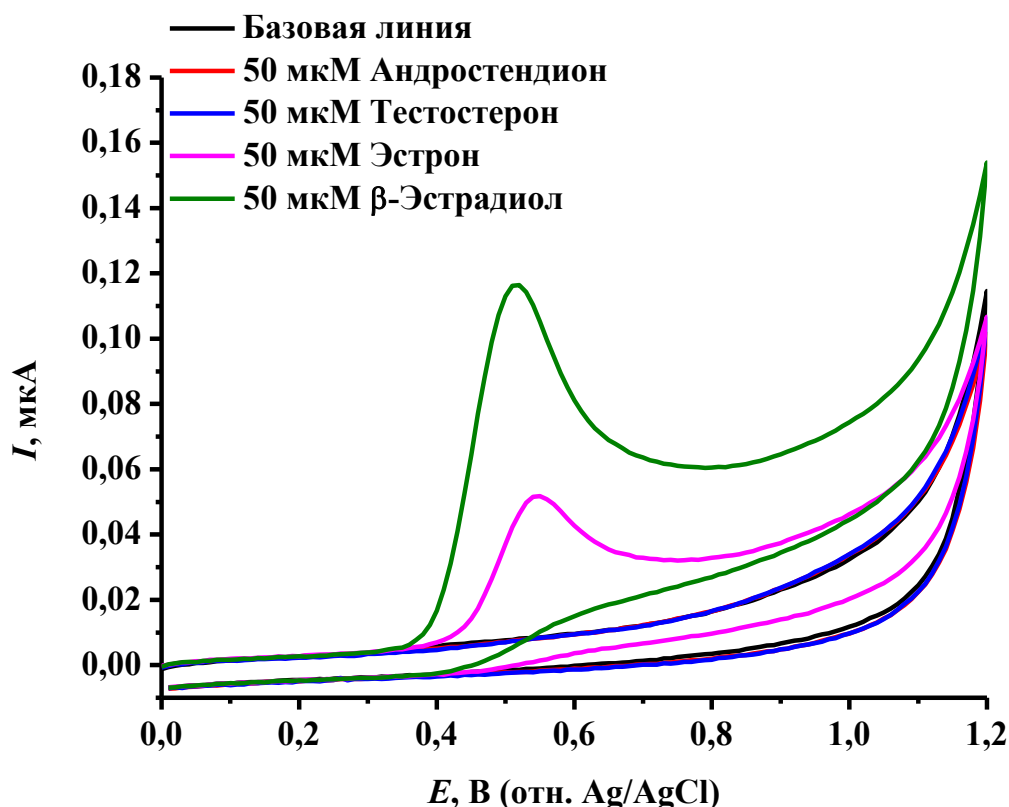


Рисунок 18. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол (—) и 50 мкМ андростендион (—), 50 мкМ тестостерон (—), 50 мкМ эстрон (—) или 50 мкМ β-эстрадиол (—). Скорость сканирования 100 мВ/с.

Для разработки методики количественного определения эстрогенов 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.

Мы проанализировали зависимости токов окисления эстрона и β-эстрадиола, зарегистрированные методом квадратно-волновой вольтамперометрии, от их концентрации в буфере (рисунки 19 А и 19 В, соответственно).

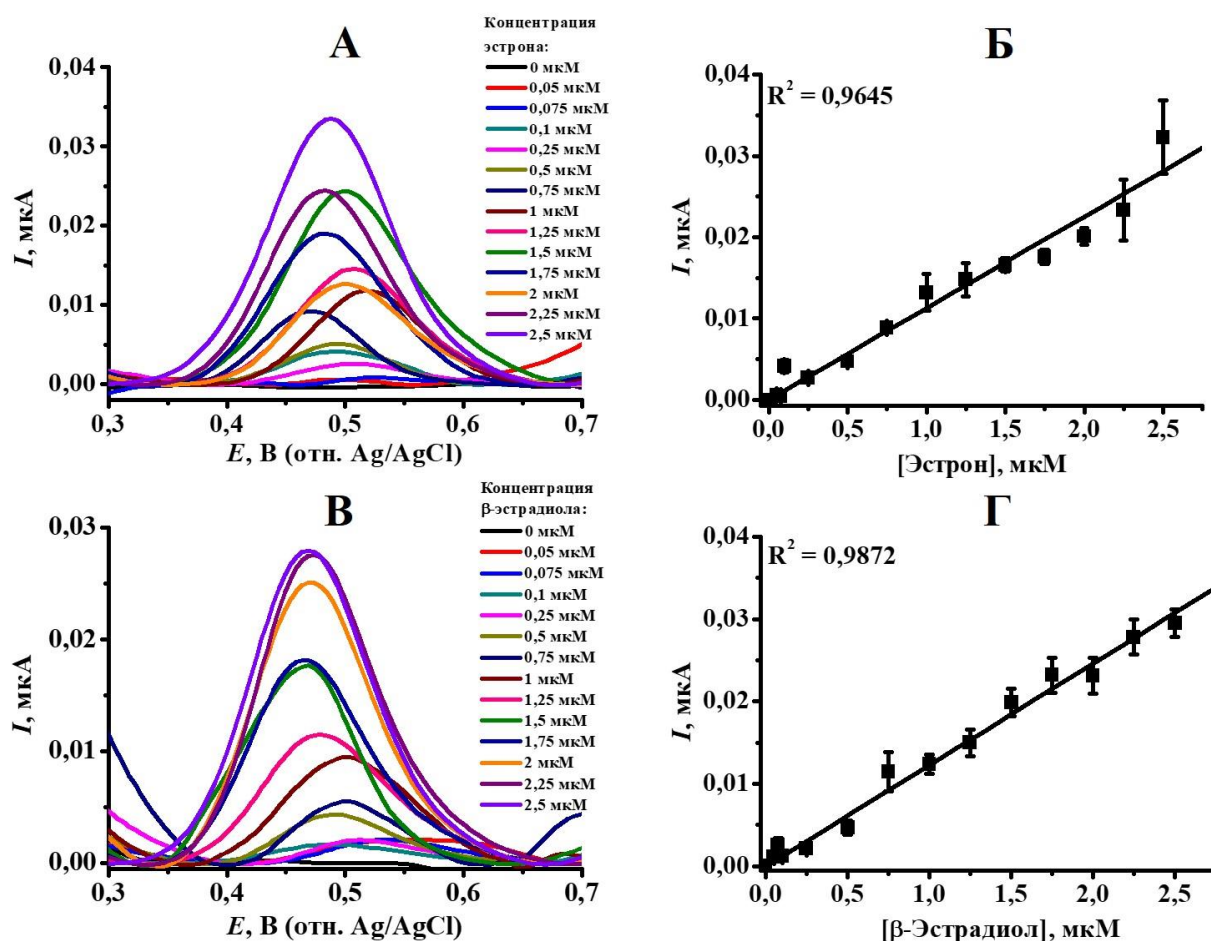


Рисунок 19. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации (от 0 до 2,5 мкМ) эстрона (А) или β-эстрадиола (В). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ. Зависимости тока окисления от концентраций эстрона (Б) или β-эстрадиола (Г). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов ± стандартные отклонения.

Потенциалы, при которых наблюдается окисление эстрона и β-эстрадиола, были соответственно определены как $0,497 \pm 0,014$ В и $0,483 \pm 0,017$ В (отн. Ag/AgCl). Как можно видеть на рисунках 19 Б и 19 Г, зависимости токов окисления эстрона и β-эстрадиола от их концентраций в буфере имеют линейный характер. Соответствующие линейные зависимости описываются уравнениями прямых: $I, \text{мкА} = (0,01042 \pm 0,0004), \text{мкА/мкМ} \times [\text{Эстрон}], \text{мкМ}$ ($R^2 = 0,9645$) для эстрона и $I, \text{мкА} = (0,01042 \pm 0,0004), \text{мкА/мкМ} \times [\beta\text{-Эстрадиол}], \text{мкМ}$ ($R^2 = 0,9872$) для β-эстрадиола.

$\text{мкА} = (0,01174 \pm 0,0003)$, $\text{мкМ/мкА} \times [\beta\text{-Эстрадиол}]$ ($R^2 = 0,9872$) для β -эстрадиола. Пределы определяемых концентраций для эстрона и β -эстрадиола были рассчитаны как 11 нМ и 3,4 нМ, соответственно. Значения чувствительности для эстрона и β -эстрадиола составили 0,010 мкА/мкМ и 0,012 мкА/мкМ, соответственно.

Таким образом, нами было показано, что эстрон и β -эстрадиол способны окисляться на немодифицированных ПГЭ. Полученные пределы определяемых концентраций эстрогенов были сравнимы со значениями аналогичного параметра, полученного ранее с помощью других электрохимических систем [219, 227].

Мы оценили возможность образования и регистрации эстрона и β -эстрадиола из соответствующих андрогенов (андростендиона и тестостерона) в процессе электрокаталитической CYP19A1-зависимой реакции в сконструированной нами электрохимической системе. CYP19A1-зависимые 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 контрольных экспериментов проводились электрокаталитические реакции при тех же условиях и с теми же субстратами в электрохимической системе с электродами, модифицированными ДДАБ, но без иммобилизованного CYP19A1. На рисунке 20 показаны квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные в инкубационной смеси после проведения электрокаталитических реакций по отношению к андростендиону и тестостерону в присутствии и без CYP19A1.

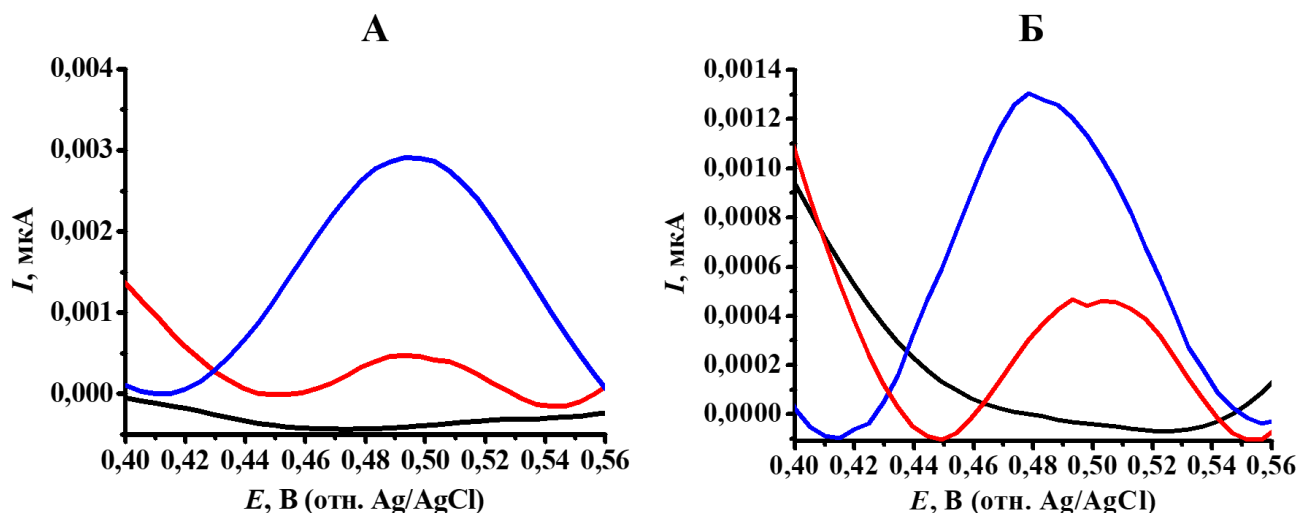


Рисунок 20. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 10 мкМ андростендион (А) или 10 мкМ тестостерон (Б), до (—) или после проведения электрокаталитической реакции в течение 30 мин при фиксированном потенциале -0,6 В (отн. Ag/AgCl) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ (—) и с иммобилизованным СУР19А1 (—). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ.

На квадратно-волновых вольтамперограммах, представленных на рисунках 20 А и 20 Б, видно, что после проведения электрохимической реакции как с ферментным электродом, так и с модифицированным электродом без фермента в области потенциалов окисления эстрогена и β -эстрадиола регистрируются соответствующие пики. Значения токов окисления эстрогена и β -эстрадиола в случае проведения электрокаталитической реакции в присутствии СУР19А1 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 эстрогенов при электрокаталитической реакции по отношению к андростендиону и тестостерону. Однако в электрохимической системе СУР19А1 вносит основной вклад в

образование продуктов, окисление которых происходит при потенциалах, соответствующих потенциалам окисления эстрона и β -эстрадиола. Как было показано ранее в других работах, АФК, генерируемые в процессе электрокаталитической реакции, вносят вклад в образование соответствующих метаболитов при проведении цитохром Р450-зависимых реакций в электрохимической системе [149]. Поскольку процесс ароматизации кольца А стероидного фрагмента андростендиона и тестостерона, катализируемый СYP19A1, является сложным трехстадийным процессом [222, 228], протекание неферментативной реакции образования эстрона и β -эстрадиола из соответствующих андрогенов в электрокаталитической системе под действием генерируемого пероксида не представляется возможным. По-видимому, регистрируемые нами пики окисления соответствуют продуктам, образующимся при неспецифической неферментативной электрокаталитической реакции по отношению к андростендиону и тестостерону.

Для определения параметров стационарной кинетики СYP19A1 – K_M и V_{max} – по отношению к андростендиону и тестостерону мы определили начальные скорости реакций образования эстрона и β -эстрадиола, регистрируемые по электрохимическому окислению соответствующих эстрогенов (рисунки 21 А и 21 Б).

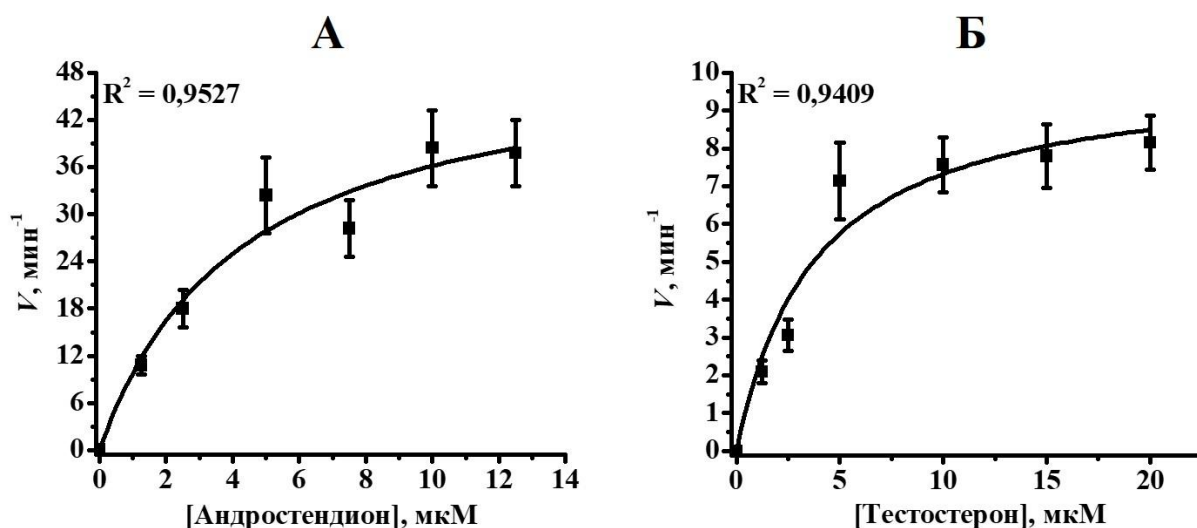


Рисунок 21. Зависимости начальной скорости СУР19А1-зависимого образования эстрогена от концентрации андростендиона (А) и β -эстрадиола от концентрации тестостерона (Б) в электрохимической системе. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

Зависимости начальных скоростей образования эстрогена и β -эстрадиола от концентраций андростендиона и тестостерона имели гиперболический характер и описывались уравнениями вида: V , $\text{мин}^{-1} = ((51,5926 \pm 7,1954), \text{мин}^{-1} \times [\text{Андростендион}], \text{мкМ}) / ((4,2491 \pm 1,5126), \text{мкМ} + [\text{Андростендион}], \text{мкМ})$ со значением $R^2 = 0,9527$ и V , $\text{мин}^{-1} = ((10,2447 \pm 1,1915), \text{мин}^{-1} \times [\text{Тестостерон}], \text{мкМ}) / ((3,8128 \pm 1,3244), \text{мкМ} + [\text{Тестостерон}], \text{мкМ})$ со значением $R^2 = 0,9409$, соответственно. Таким образом, значения V_{max} реакций образования эстрогена и β -эстрадиола, катализируемых СУР19А1 в электрохимической системе, были рассчитаны как $51,6 \pm 7,2 \text{ мин}^{-1}$ и $10,2 \pm 1,2 \text{ мин}^{-1}$, соответственно. Значения K_M СУР19А1 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 СУР19А1 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.

Полученные нами кинетические параметры СУР19А1 в электрохимической системе мы сравнили с кинетическими параметрами фермента в

реконструированной системе. В реконструированной системе значение $V_{\max}$ конверсии андростендиона в эстрон ранее было определено как $3,6 \pm 0,18 \text{ мин}^{-1}$ [222], что приблизительно на порядок меньше $V_{\max}$ данной реакции, протекающей в электрохимической системе при участии CYP19A1. По-видимому, данные различия могут быть обусловлены влиянием пероксида водорода, генерируемого в электрокаталитическом процессе, на CYP19A1-зависимую конверсию андростендиона до эстрона [149]. Кроме того, в электрохимической системе процесс восстановления цитохрома P450 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. Ранее значение K_M CYP19A1 по отношению к андростендиону в реконструированной системе было определено как $0,044 \pm 0,006 \text{ мкМ}$ [222], что приблизительно на два порядка меньше значения K_M фермента в электрохимической системе. По-видимому, 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 величина $V_{\max}/K_M$ в электрохимической системе. Значение K_M CYP19A1 по отношению к тестостерону в суперсомах было определено ранее как $0,023 \pm 0,004 \text{ мкМ}$ [229], что также на два порядка меньше, чем аналогичный параметр, определенный нами с помощью электрохимической системы.

Параметры стационарной кинетики CYP19A1 в электрохимической системе обобщены в таблице 1.

Таблица 1. Параметры стационарной кинетики CYP19A1-зависимых реакций, протекающих в электрохимической системе, по отношению к андростендиону и тестостерону.

Субстрат	$V_{\max}$, мин ⁻¹	K_M , мкМ	$V_{\max}/K_M$, мин ⁻¹ мкМ ⁻¹
Андростендион	$51,6 \pm 7,2$	$4,2 \pm 1,5$	12,29
Тестостерон	$10,2 \pm 1,2$	$3,8 \pm 1,3$	2,68

Как отмечалось выше, CYP19A1 является молекулярной фармакологической мишенью для действия препаратов-ингибиторов, применяющихся для лечения рака молочной железы. В связи с этим является актуальным поиск и исследование новых эффективных ингибиторов CYP19A1. На примере известного препарата – экземестана – мы продемонстрировали возможность применения разработанной электрохимической системы на основе CYP19A1 для исследования ингибиторной активности соединений, являющихся потенциальными лекарственными препаратами для лечения рака молочной железы.

Экземестан имеет андростендион-подобную структуру (рисунок 22) и способен подвергаться конверсии при участии CYP19A1 с образованием метаболита, ингибирующего ароматазу [230] (ингибирование, основанное на механизме действия фермента).

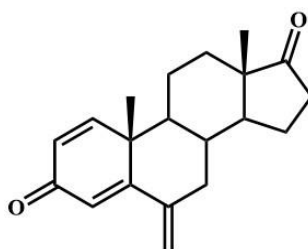


Рисунок 22. Структурная формула экземестана.

Упрощенная кинетическая модель ингибирования, основанного на механизме действия фермента, представлена на рисунке 23 [231, 232].

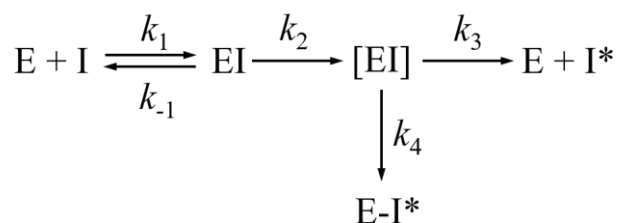


Рисунок 23. Упрощенная кинетическая модель ингибирования, основанного на механизме действия фермента.

Как видно на рисунке 23, ингибитор (I) образует с ферментом (E) комплекс с константой скорости прямой реакции k_1 , распад комплекса характеризуется константой скорости k_{-1} . Интермедиат каталитической реакции ([EI]), образовавшийся с константой скорости k_2 из фермент-ингибиторного комплекса (EI), подвергается дальнейшему продуктивному распаду с константой скорости k_3 на фермент и высокореакционный продукт (I^*), либо высокореакционный продукт образует прочный комплекс с ферментом (E-I^*) с константой скорости k_4 , что приводит к инактивации фермента.

Основными параметрами, характеризующими ингибирование, основанное на механизме действия, 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 18 [233]:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}} [\text{I}]}{K_I + [\text{I}]}, \quad (18)$$

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

Для механизма, представленного на рисунке 23, k_{inact} и K_I могут быть выражены уравнениями 19 и 20, соответственно [232]:

$$k_{\text{inact}} = \frac{k_2 k_4}{k_2 + k_3 + k_4}. \quad (19)$$

$$K_I = \frac{(k_{-1} + k_2)(k_3 + k_4)}{k_1(k_2 + k_3 + k_4)}. \quad (20)$$

Для исследования ингибирования CYP19A1, основанного на механизме действия фермента, были проведены 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 CYP19A1 по отношению к 10 мкМ андростендиону. Зависимости логарифма процента остаточной активности CYP19A1 по отношению к 10 мкМ андростендиону от времени электрокаталитической реакции в присутствии различных концентраций экземестана (0-10000 нМ) представлены на рисунке 24.

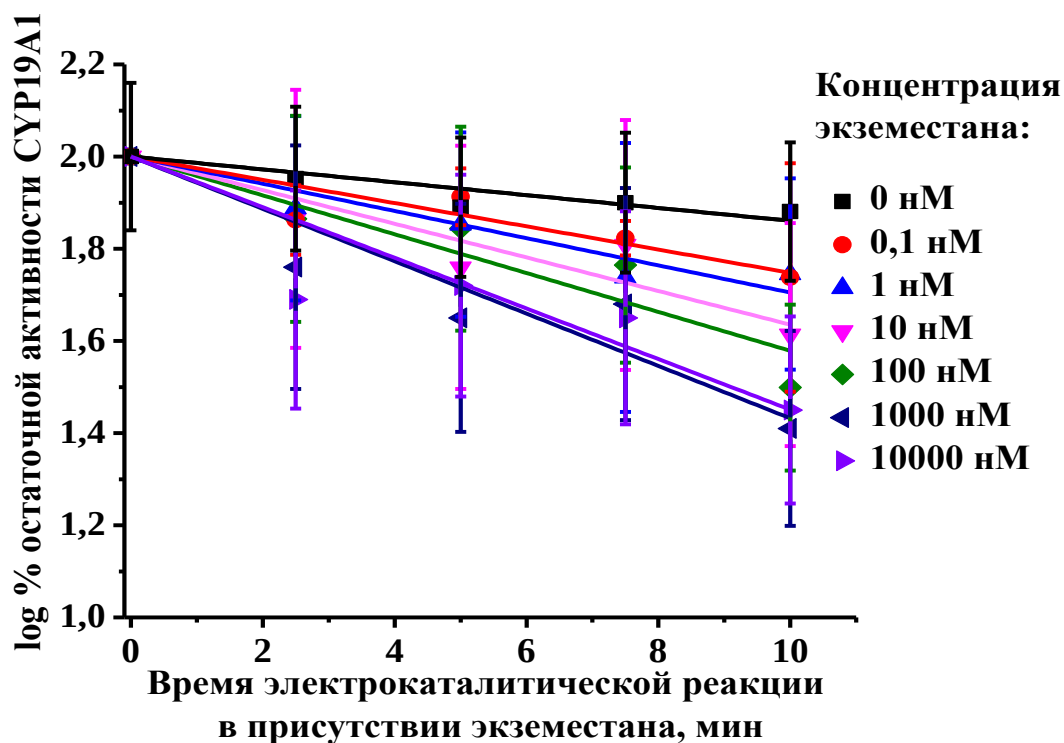


Рисунок 24. Зависимости логарифма процента остаточной активности ($\log \%$ остаточной активности) CYP19A1 по отношению к 10 мкМ андростендиону от времени CYP19A1-зависимой электрокаталитической реакции в присутствии различных концентраций экземестана (0-10000 нМ). Реакции по отношению к экземестану проводились в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 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 (pH 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 24 зависимостей были определены тангенсы углов наклонов, соответствующие значениям k_{obs} . Чтобы определить истинные значения k_{obs} , значение тангенса угла наклона зависимости логарифма процента остаточной активности CYP19A1 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, которая описывалась уравнением вида: $\Delta k_{\text{obs}}, \text{ мин}^{-1} = ((0,0381 \pm 0,0034), \text{ мин}^{-1} \times [\text{Экземестан}], \text{ нМ}) / ((3,0313 \pm 2,6608), \text{ нМ} + [\text{Экземестан}], \text{ нМ})$ (рисунок 25).

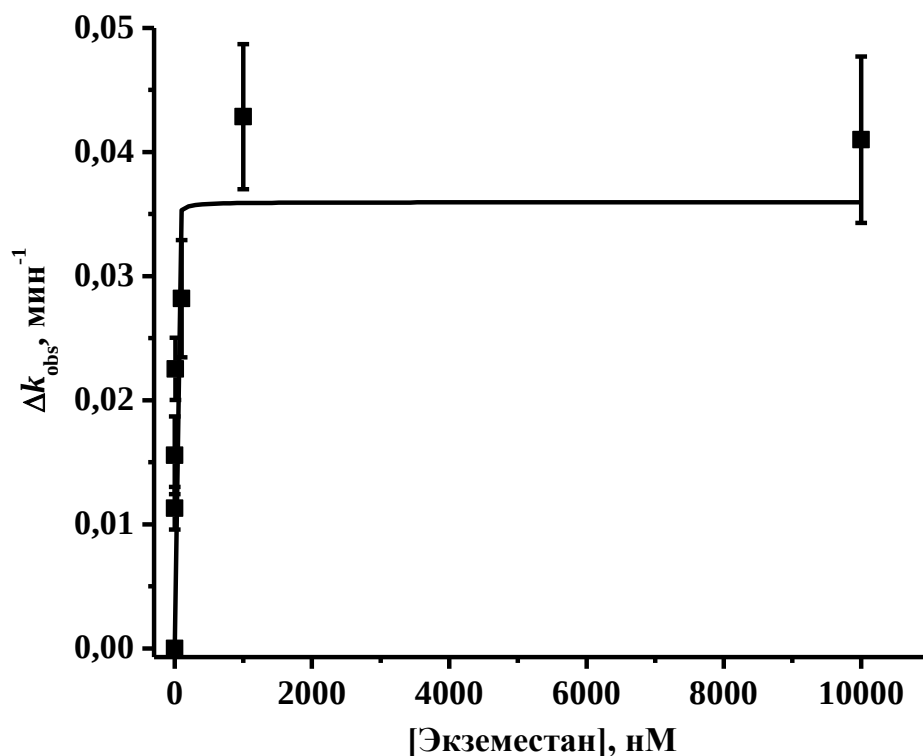


Рисунок 25. Зависимость значений Δk_{obs} от концентрации экземестана (0-10000 нМ). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

Таким образом, из зависимости, представленной на рисунке 25, было получено значение k_{inact} , которое составило $0,038 \pm 0,003 \text{ мин}^{-1}$. Время полуинактивации ($t_{1/2}$) СYP19A1 в присутствии экземестана рассчитывалось в соответствии с уравнением 21 [234]:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{\text{inact}}}, \quad (21)$$

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

Полиморфизм гена *CYP2C9*, приводящий к образованию ферментов с измененной активностью, повышает риск развития кровотечений при приеме варфарина [239, 240]. Кроме того, ряд лекарственных препаратов может изменять метаболизм варфарина, ингибируя *CYP2C9* [139, 240]. Таким образом, исследование метаболизма варфарина в комбинации с другими лекарственными соединениями является важной задачей фармакологии.

Разработаны подходы к количественному определению варфарина, основанные на его необратимом электрохимическом окислении [241-248]. При этом электрохимические свойства (S)-7-гидроксиварфарина, образующегося в процессе *CYP2C9*-зависимой биотрансформации, ранее не были исследованы. Мы предположили, что потенциалы электрохимического окисления (S)-варфарина отличаются от потенциалов электрохимического окисления (S)-7-гидроксиварфарина за счет наличия у последнего гидроксифенильной группы. Это различие в электрохимических свойствах может быть использовано для идентификации и количественного определения (S)-7-гидроксиварфарина в *CYP2C9*-содержащей ферментативной системе без разделения компонентов инкубационной смеси.

Разработка электрохимического подхода к количественному определению (S)-7-гидроксиварфарина как продукта биотрансформации (S)-варфарина, в идеале не требующая этапа его выделения из реакционной системы, представляется перспективной задачей для улучшения аналитических свойств электрохимических систем на основе *CYP2C9*. Такой подход может быть использован для выявления межлекарственных взаимодействий на уровне *CYP2C9*.

С помощью циклической вольтамперометрии и немодифицированных ПГЭ мы исследовали электрохимические свойства (S)-варфарина и (S)-7-гидроксиварфарина при их концентрации 100 мкМ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и 1% (по объему) метанол, в диапазоне потенциалов от 0 до 1,2 В (отн. Ag/AgCl) (рисунок 27).

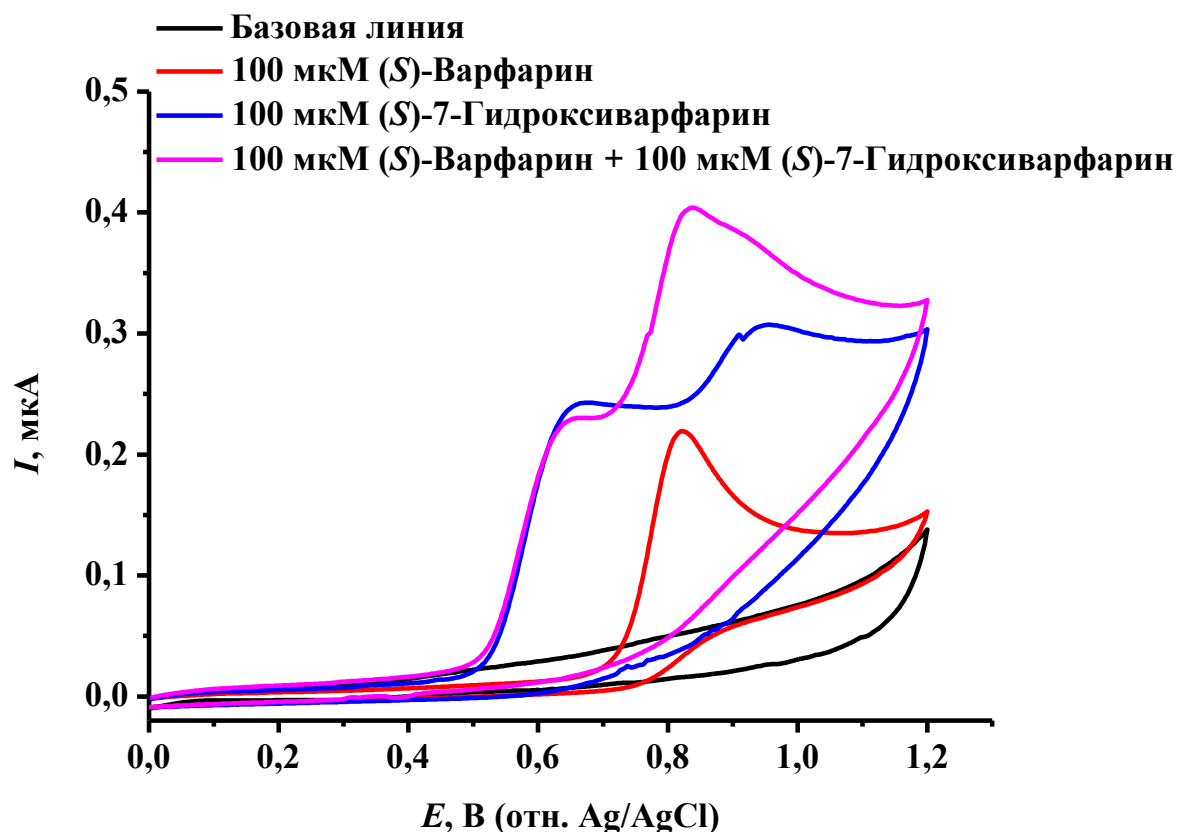


Рисунок 27. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол (—) и 100 мкМ (S)-варфарин (—), 100 мкМ (S)-7-гидроксиварфарин (—) или смесь 100 мкМ (S)-варфарина и 100 мкМ (S)-7-гидроксиварфарина (—). Скорость сканирования 100 мВ/с.

На представленном рисунке 27 видно, что (S)-варфарин и (S)-7-гидроксиварфарин необратимо окисляются на поверхности немодифицированных ПГЭ, о чем свидетельствует наличие пиков окисления и отсутствие пиков восстановления в исследуемом диапазоне потенциалов. (S)-варфарин имеет один пик окисления при потенциале около 0,820 В (отн. Ag/AgCl), что согласуется с ранее опубликованными результатами [241]. (S)-7-гидроксиварфарин имеет два пика окисления: первый – при потенциалах около 0,600 В (отн. Ag/AgCl) и второй – около 0,900 В (отн. Ag/AgCl). Мы предположили, что появление пика при потенциале около 0,600 В обусловлено электрохимическим окислением гидроксифенильной группы (S)-7-гидроксиварфарина. В эквимольной смеси (S)-

варфарина и (S)-7-гидроксиварфарина наблюдаются пики окисления при потенциалах около 0,600 В (отн. Ag/AgCl), идентичный пику окисления (S)-7-гидроксиварфарина в этом диапазоне потенциалов, и около 0,800 В (отн. Ag/AgCl), по-видимому, обусловленный суммарным вкладом процессов окисления (S)-варфарина и (S)-7-гидроксиварфарина в этом диапазоне потенциалов.

Таким образом, механизм электрохимического окисления (S)-варфарина отличается от механизма электрохимического окисления продукта его СУР2С9-зависимого гидроксилирования – (S)-7-гидроксиварфарина.

Мы исследовали влияние рН 100 мМ калий-фосфатного фонового электролита, содержащего 50 мМ NaCl и 1% (по объему) метанол, на потенциалы пиков окисления (S)-7-гидроксиварфарина (рисунок 28 А).

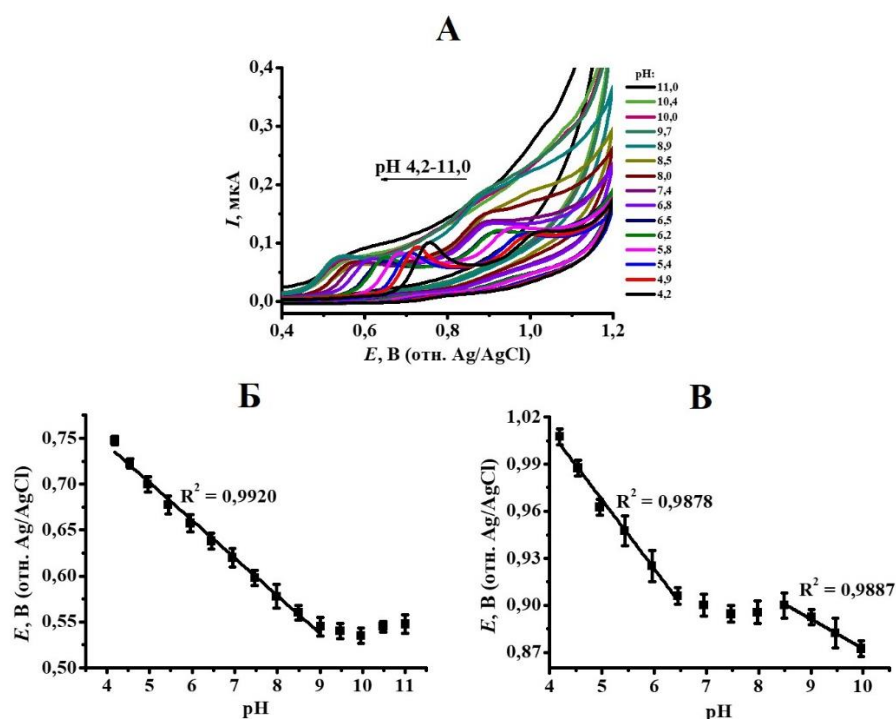


Рисунок 28. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном фоновом электролите, содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 10 мкМ (S)-7-гидроксиварфарин, при различных значениях рН (от 4,2 до 11,0). Скорость сканирования 100 мВ/с (А). Зависимости потенциала первого (Б) и второго (В) пика окисления (S)-7-гидроксиварфарина от рН. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

Потенциал первого пика окисления (S)-7-гидроксиварфарина, по-видимому, соответствующий электрохимическому окислению гидроксифенильной группы, варьировал от 0,75 В (отн. Ag/AgCl) до 0,55 В (отн. Ag/AgCl) в диапазоне pH 4,2-11,0 (рисунок 28 Б). При этом потенциал первого пика окисления (S)-7-гидроксиварфарина линейно зависел от pH в диапазоне 4,2-9,0 ($R^2 = 0,9920$), а при pH 9,0 наблюдалось отклонение от линейной зависимости и потенциал пика окисления незначительно изменялся при повышении pH. Можно предположить, что такая зависимость потенциала первого пика окисления от pH обусловлена влиянием диссоциации гидроксифенильной группы (S)-7-гидроксиварфарина при значении pK_a , близкого к pH 9,0 [249]. Тангенс угла наклона линейной зависимости потенциала пика окисления от pH в диапазоне 4,2-9,0 был рассчитан как $-0,0411 \pm 0,0012$ В/pH, что отличается от теоретического значения для электрохимического процесса, в котором участвует одинаковое количество электронов и протонов ($-0,059$ В/pH).

Потенциал второго пика окисления (S)-7-гидроксиварфарина в диапазоне pH 4,2-10,0 варьировал от 1 В (отн. Ag/AgCl) до 0,870 В (отн. Ag/AgCl) (рисунок 28 В). При pH выше 10,0 этот пик практически не определялся. Зависимость потенциала пика окисления от pH имела два линейных участка: в диапазонах pH 4,2-6,5 ($R^2 = 0,9878$) и 8,5-10,0 ($R^2 = 0,9887$). При значении pH около 6,5 наблюдалось отклонение от линейной зависимости. Первый линейный диапазон имел тангенс угла наклона $-0,044 \pm 0,0022$ В/pH, что также указывает на неодинаковое количество электронов и протонов, участвующих в электрохимическом процессе. Второй линейный диапазон имел тангенс угла наклона $-0,019 \pm 0,0012$ В/pH, также указывая на неодинаковое количество электронов и протонов, вовлеченных в электрохимический процесс. Отклонение от линейной зависимости потенциала пика окисления в диапазоне pH 6,5-8,5 может быть связано с достижением значений pH, близких к значению pK_a 4-гидроксигруппы, участвующей в электрохимическом процессе [250].

Стоит отметить, что электрохимические свойства производных кумарина, включая 7-гидроксипроизводные, хорошо изучены. Ранее было предположено, что

7-гидроксикумарин может полимеризоваться при электрохимическом окислении; однако тангенсы углов наклонов зависимостей пиков окисления от pH в диапазоне 2-7 свидетельствовали об одинаковом количестве электронов и протонов, участвующих в реакции, тогда как значения pK_a были примерно равны 7 [251, 252], что ниже значения pK_a , которое было определено нами. Суммируя полученные данные, можно предположить, что один из наиболее вероятных механизмов электрохимического окисления (S)-7-гидроксиварфарина на поверхности ПГЭ соответствует общему механизму окисления фенолов [174].

Для разработки методики количественного определения (S)-7-гидроксиварфарина в ферментативных системах по пику его электрохимического окисления в области 0,600 В (отн. Ag/AgCl) мы использовали квадратно-волновую вольтамперометрию, поскольку данный метод имеет более высокое соотношение сигнал/шум, по сравнению с вольтамперометрией с линейной разверткой. В квадратно-волновой вольтамперометрии аналитический пик был зарегистрирован при $0,590 \pm 0,020$ В (отн. Ag/AgCl). Мы проанализировали амплитуду пика окисления (S)-7-гидроксиварфарина при данном потенциале в диапазоне концентраций этого соединения от 0 до 1 мкМ (рисунок 29 А).

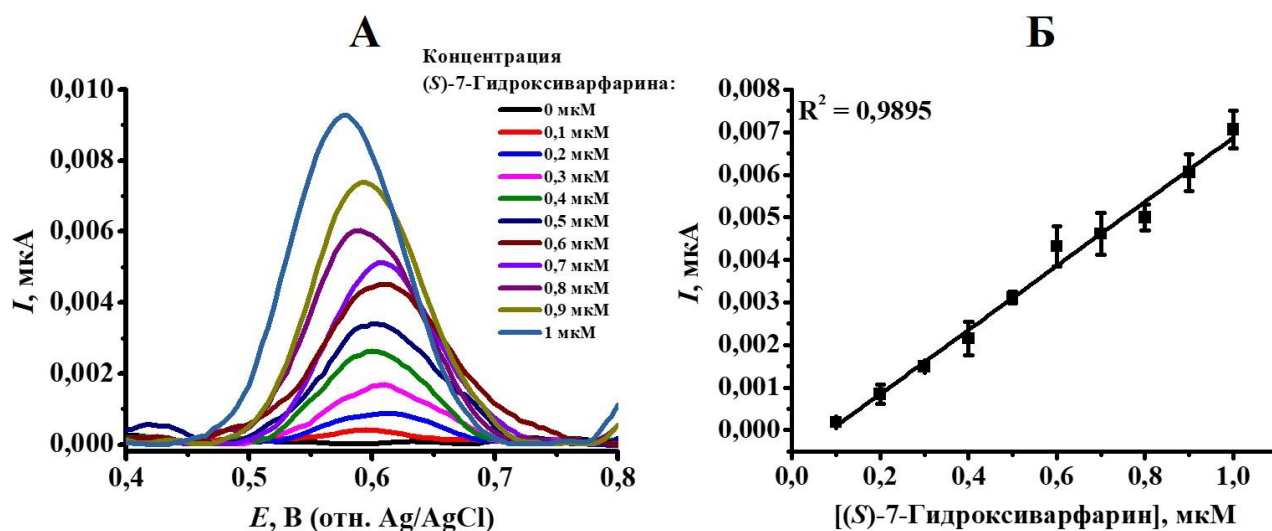


Рисунок 29. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации (S)-7-гидроксиварфарина (от 0 до 1 мкМ) (А). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ. Зависимость тока пика окисления от концентрации (S)-7-гидроксиварфарина (Б). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

Амплитуда пика окисления линейно зависела от концентрации (S)-7-гидроксиварфарина ($R^2 = 0,9895$) и описывалась уравнением вида: $I, \text{мкА} = (0,00754 \pm 0,00026), \text{мкА/мкМ} \times [(S)\text{-7-гидроксиварфарин}], \text{М} - (0,00066 \pm 0,00016), \text{мкА}$ (рисунок 29 Б).

Значения предела определяемых концентраций (S)-7-гидроксиварфарина и чувствительности были рассчитаны как 91 нМ и 0,0075 мкА/мкМ, соответственно.

Для оценки возможности количественного электрохимического определения (S)-7-гидроксиварфарина, образующегося в ходе CYP2C9-зависимой электрокаталитической реакции, была использована электрохимическая система на основе рекомбинантного CYP2C9 человека, иммобилизованного на поверхности модифицированных ПГЭ. Схожая электрохимическая система ранее применялась группой Gilardi для определения активности CYP2C9 по отношению к (S)-варфарину, однако продукт ферментативной реакции определялся методом ВЭЖХ

[99]. Поскольку известно, что СУР2С9 по отношению к (S)-варфарину характеризуется относительно невысоким значением k_{cat} [253], с целью наработки достаточного для определения количества (S)-7-гидроксиварфарина мы использовали для иммобилизации фермента ПГЭ DropSens с большей геометрической площадью рабочего электрода ($0,1256 \text{ см}^2$), по сравнению с геометрической площадью рабочего электрода ПГЭ «КолорЭлектроникс» ($0,0314 \text{ см}^2$).

Электрохимические свойства СУР2С9, иммобилизованного на ПГЭ, модифицированных ДДАБ, были охарактеризованы с помощью циклической вольтамперометрии в насыщенном аргоне (анаэробные условия) 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl при скорости сканирования 100 мВ/с (рисунок 30).

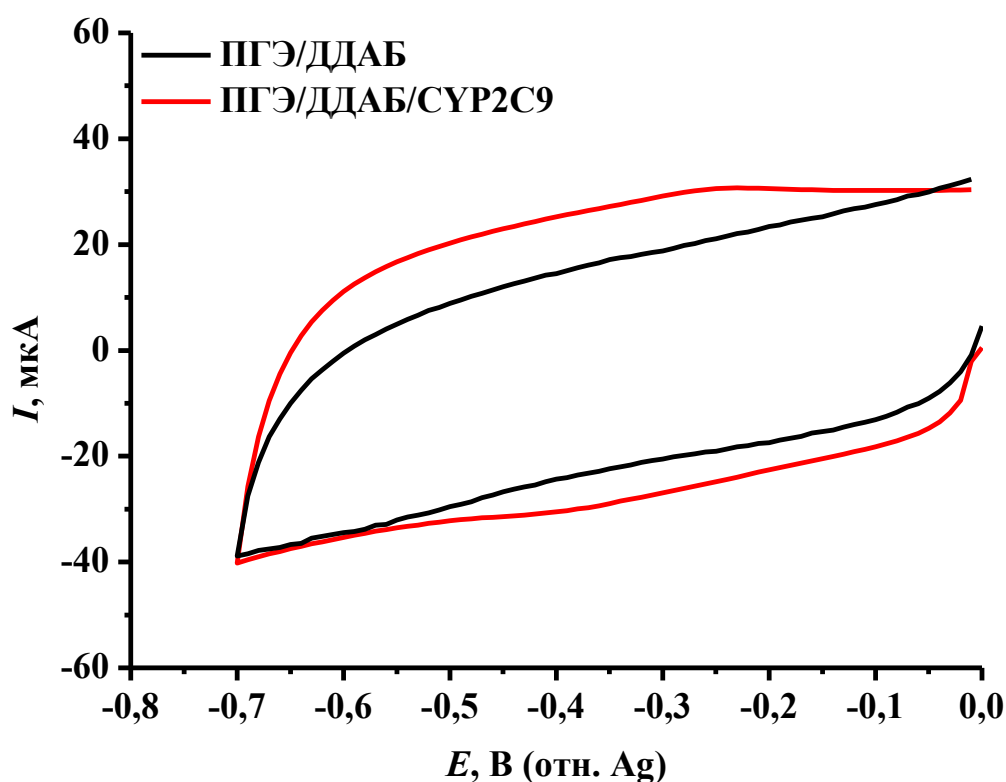


Рисунок 30. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ (—), и с иммобилизованным СУР2С9 (—) в насыщенном аргоне 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl. Скорость сканирования 100 мВ/с.

Как показано на рисунке 30, циклические вольтамперограммы СУР2С9 в анаэробных условиях имеют два пика, соответствующие процессам восстановления и окисления иона железа гема фермента. Значения E_c и E_a пиков были определены как $-0,365 \pm 0,021$ В (отн. Ag) и $-0,250 \pm 0,014$ В (отн. Ag), соответственно. Значение E_m было рассчитано как $-0,308 \pm 0,035$ В (отн. Ag). Значение ΔE рассчитано как 115 мВ. В соответствии с моделью Лавирона, значение k_s при скорости сканирования 100 мВ/с и α 0,5 было определено как $0,8 \pm 0,2$ с⁻¹. В соответствии с уравнением 10, количество электроактивного СУР2С9 было рассчитано из циклических вольтамперограмм как $26,1 \pm 9,5$ пмоль.

Мы провели ферментативную электрокаталитическую реакцию по отношению к 50 мкМ (S)-варфарину в аэробных условиях при контролируемом потенциале рабочего ферментного электрода -0,6 В (отн. Ag) в течение 60 мин. Мы также оценили возможный вклад АФК в возможное окисление (S)-варфарина и образование продуктов реакции, электроактивных при потенциалах, близких к потенциалам окисления (S)-7-гидроксиварфарина. С этой целью мы провели неферментативную электрокаталитическую реакцию по отношению к 50 мкМ (S)-варфарину в течение 60 мин, используя электрод, модифицированный ДДАБ, без фермента. На рисунке 31 показано, что после электрокаталитической реакции с ферментным электродом по отношению к 50 мкМ (S)-варфарину регистрируется пик электрохимического окисления при потенциале, идентичном потенциалу окисления (S)-7-гидроксиварфарина (около 0,6 В (отн. Ag/AgCl)), тогда как после проведения электрокаталитической реакции без фермента на электроде по отношению к 50 мкМ (S)-варфарину пик электрохимического окисления в области этого потенциала отсутствует.

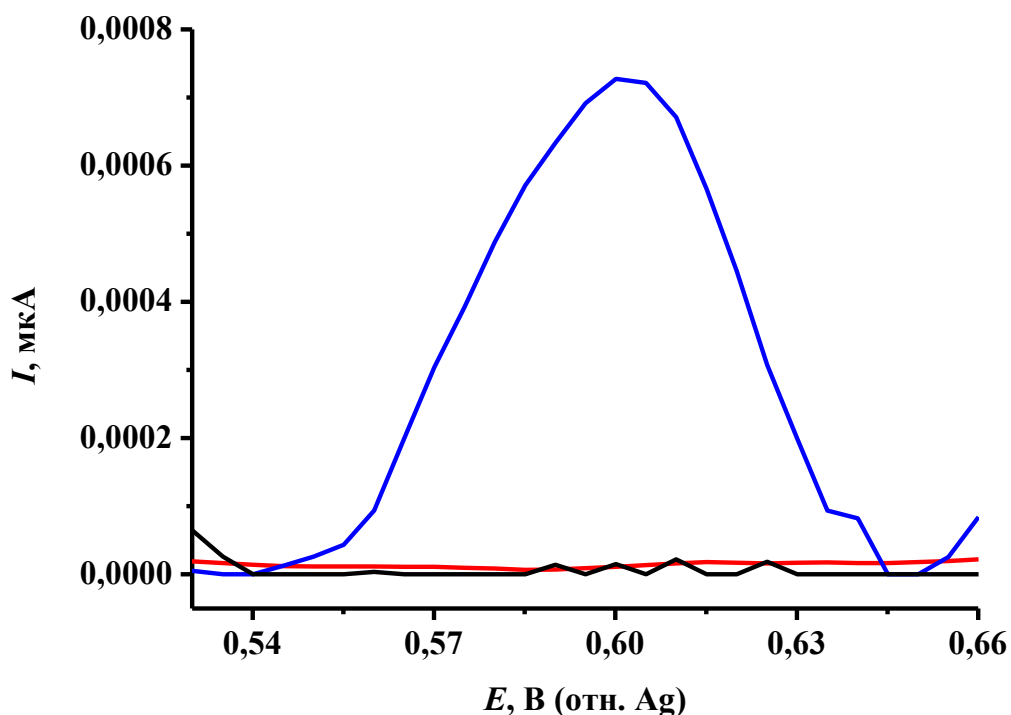


Рисунок 31. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 50 мкМ (S)-варфарин, до (—) или после проведения электрокаталитической реакции в течение 60 мин при фиксированном потенциале -0,6 В (отн. Ag) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ (—) и с иммобилизованным CYP2C9 (—). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что в сконструированной электрохимической системе образование (S)-7-гидроксиварфарина происходит при участии CYP2C9, а не за счет окисления (S)-варфарина АФК, генерируемые в процессе электрокатализа.

Мы исследовали зависимость начальной скорости CYP2C9-зависимого образования (S)-7-гидроксиварфарина от концентрации (S)-варфарина в электрохимической системе. Зависимость, представленная на рисунке 32, имела гиперболический характер ($R^2 = 0,9948$) и описывалась уравнением вида: V , мин⁻¹

$$= ((0,10022 \pm 0,00196), \text{ мин}^{-1} \times [(S)\text{-Варфарин}], \text{ мкМ}) / ((3,03262 \pm 0,37767), \text{ мкМ} + [(S)\text{-Варфарин}], \text{ мкМ}).$$

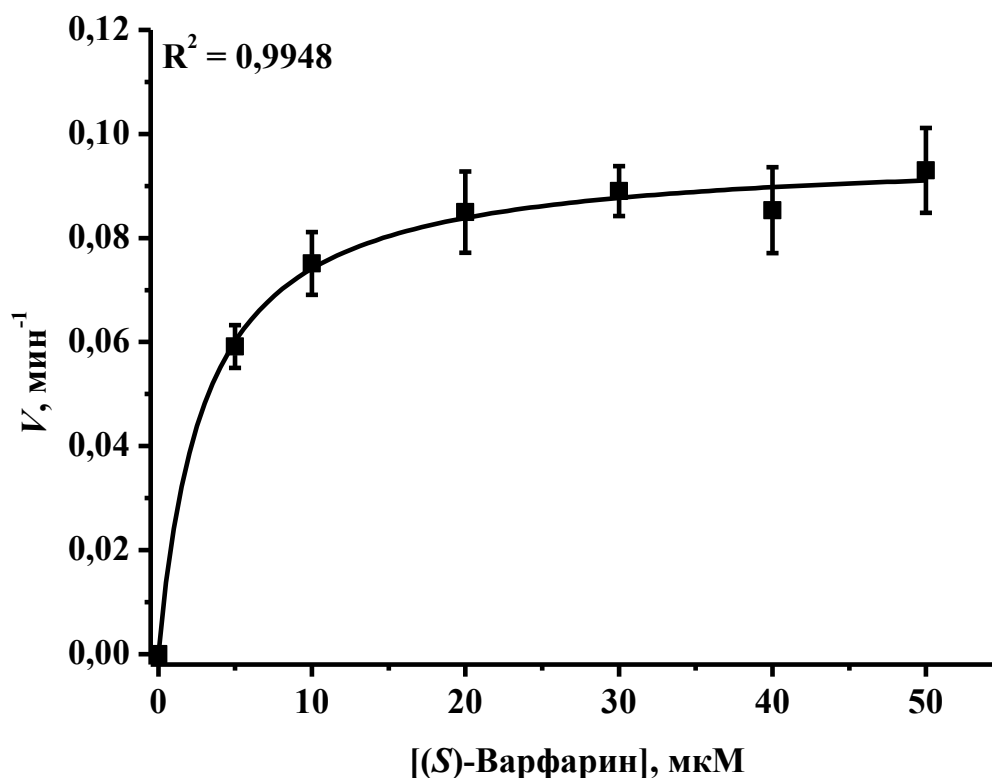


Рисунок 32. Зависимость начальной скорости CYP2C9-зависимого образования (S)-7-гидроксиварфарина от концентрации (S)-варфарина в электрохимической системе. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

Стоит отметить, что при концентрациях (S)-варфарина ниже 5 мкМ концентрация образующегося в ходе CYP2C9-зависимой электрокаталитической реакции (S)-7-гидроксиварфарина была ниже предела определяемых концентраций и не могла быть достоверно зарегистрирована с помощью разработанного подхода. Эта проблема может быть решена с помощью использования подходящих модификаторов электродов для увеличения чувствительности, что может быть задачей для дальнейшего улучшения аналитических характеристик предложенного нами подхода.

Из зависимости, представленной на рисунке 32, мы определили параметры стационарной кинетики CYP2C9 по отношению к (S)-варфарину в электрохимической системе. Значения $V_{\max}$ и K_M были определены как $0,100 \pm 0,002$ мин⁻¹ и $3,03 \pm 0,38$ мкМ, соответственно. Отношение $V_{\max}/K_M$ было рассчитано как $0,033$ мин⁻¹ мкМ⁻¹. Несмотря на то, что иммобилизация ферментов может приводить к значительным изменениям кинетических параметров, наши данные оказались сопоставимы с аналогичными параметрами стационарной кинетики, полученными ранее с помощью альтернативных CYP2C9-содержащих ферментативных систем [253-257]. Для сравнения, в таблице 2 представлены кинетические параметры CYP2C9 по отношению к (S)-варфарину, полученные с помощью различных ферментативных систем.

Таблица 2. Сравнение кинетических параметров CYP2C9 по отношению к (S)-варфарину, полученных с помощью различных ферментативных систем.

Ферментативная система	$V_{\max}$, мин⁻¹	K_M, мкМ	$V_{\max}/K_M$, мин⁻¹ мкМ⁻¹	Ссылка
Реконструированная система	$0,25 \pm 0,004$	$4,1 \pm 0,3$	0,06	[253]
Микросомальная	$0,22 \pm 0,007$	18 ± 2	0,0122	[254]
Бакулосомы	$0,0641 \pm 0,0135$	$2,5 \pm 1,1$	0,0282	[255]
Клетки HepG2, экспрессирующие CYP2C9 и его редокс-партнеры	$0,31 \pm 0,01$	$3,3 \pm 0,1$	0,0925	[256]

Продолжение таблицы 2

Клетки COS-7, экспрессирующие CYP2C9 и его редокс-партнеры	$1,8 \pm 0,04$	$2,92 \pm 0,25$	0,61	[257]
Электрохимическая система	$0,100 \pm 0,002$	$3,03 \pm 0,38$	0,033	Данная работа

Таким образом, мы продемонстрировали возможность оценки электрокаталитической активности CYP2C9 по отношению к (S)-варфарину путем количественного электрохимического определения (S)-7-гидроксиварфарина, являющегося продуктом ферментативной реакции. Мы предполагаем, что предложенный подход перспективен для выявления межлекарственных взаимодействий на уровне CYP2C9. Дальнейшее улучшение аналитических характеристик предложенного подхода может быть направлено на увеличение чувствительности методики путем использования химических модификаторов электродов, служащих для количественного определения (S)-7-гидроксиварфарина.

3.1.3. Биэлектродная электрохимическая система для определения каталитической активности CYP2C9 по отношению к диклофенаку

Диклофенак часто используется как маркерный субстрат CYP2C9 при оценке возможного возникновения межлекарственных взаимодействий на уровне этого фермента или для изучения взаимодействия продуктов растительного происхождения с CYP2C9. Мы предположили, что различия в электрохимических свойствах диклофенака и 4'-гидроксидиклофенака, образующегося при участии CYP2C9, могут быть использованы для разработки электрохимической системы для определения активности данного изофермента цитохрома P450.

Электрохимические свойства 4'-гидроксидиклофенака были охарактеризованы нами на немодифицированных ПГЭ методом циклической вольтамперометрии в диапазоне от -0,7 до 1,2 В (отн. Ag/AgCl) (рисунок 33).

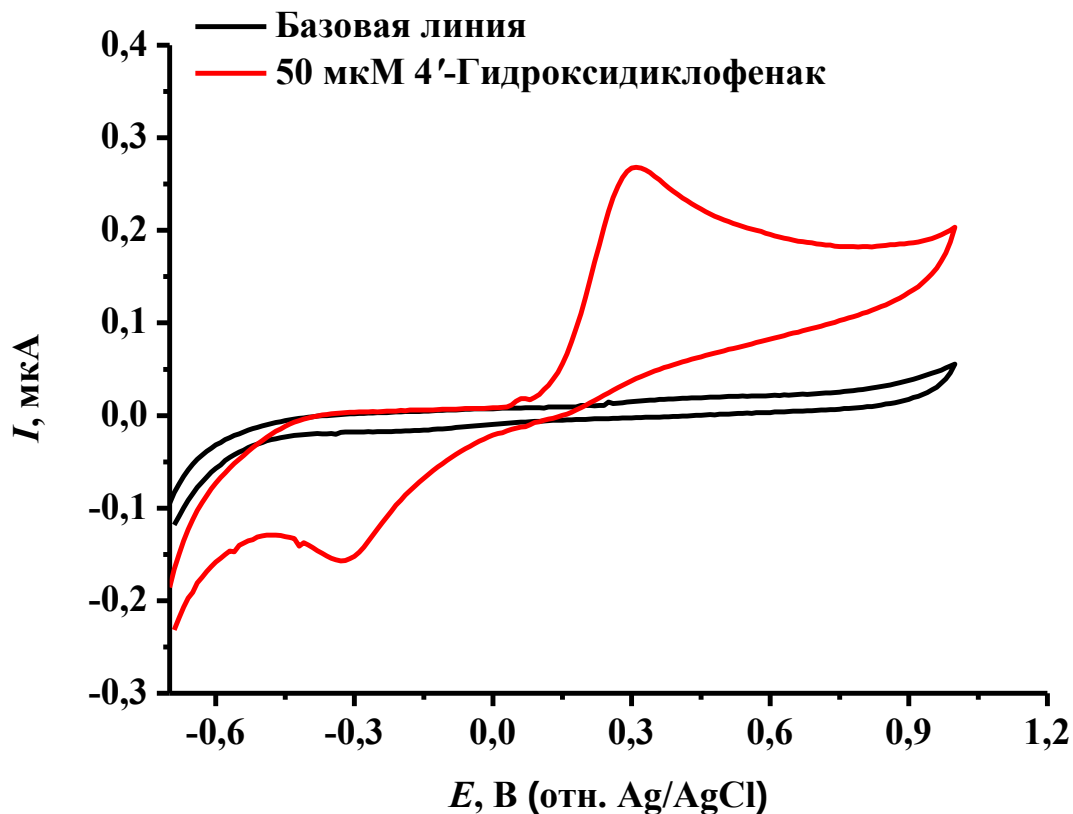


Рисунок 33. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол (—) и 50 мкМ 4'-гидроксидиклофенак (—). Скорость сканирования 100 мВ/с.

Циклическая вольтамперограмма 4'-гидроксидиклофенака характеризуется наличием пика окисления при $0,297 \pm 0,012$ В (отн. Ag/AgCl) и пика восстановления при $-0,308 \pm 0,018$ В (отн. Ag/AgCl). Мы предположили, что соответствующие пики отражают процесс окисления 4'-гидроксидиклофенака, приводящий к образованию хинониминного производного, и его последующее восстановление (рисунок 34). Полученная с помощью немодифицированных ПГЭ характеристика электрохимического процесса для 4'-гидроксидиклофенака согласуется с

характеристикой электрохимического процесса для этого соединения, полученной ранее с помощью СУЭ [187].

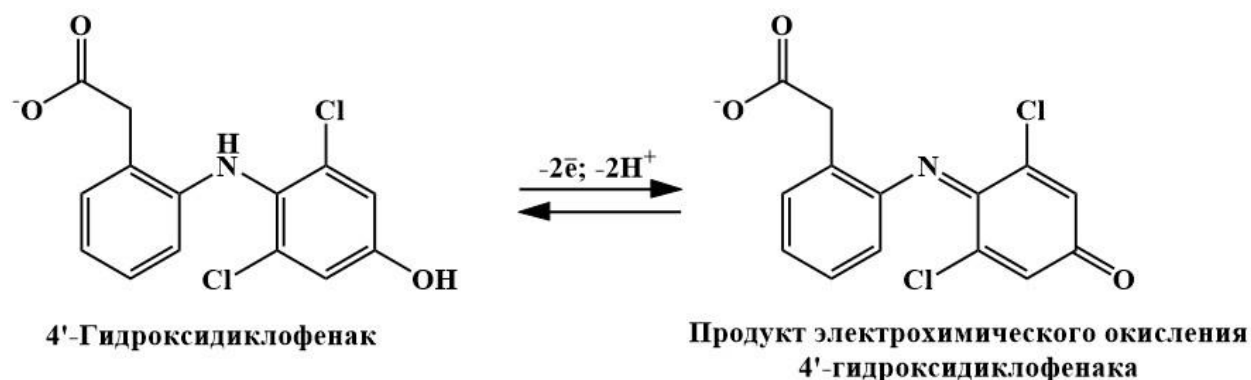


Рисунок 34. Предполагаемый механизм электрохимического окисления 4'-гидроксидиклофенака.

Мы сравнили электрохимические свойства диклофенака (50 мкМ), 4'-гидроксидиклофенака (50 мкМ) и их эквимольной смеси в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и 1% (по объему) метанол, в области потенциалов от 0 до 1,2 В (отн. Ag/AgCl) методом циклической вольтамперометрии (рисунок 35).

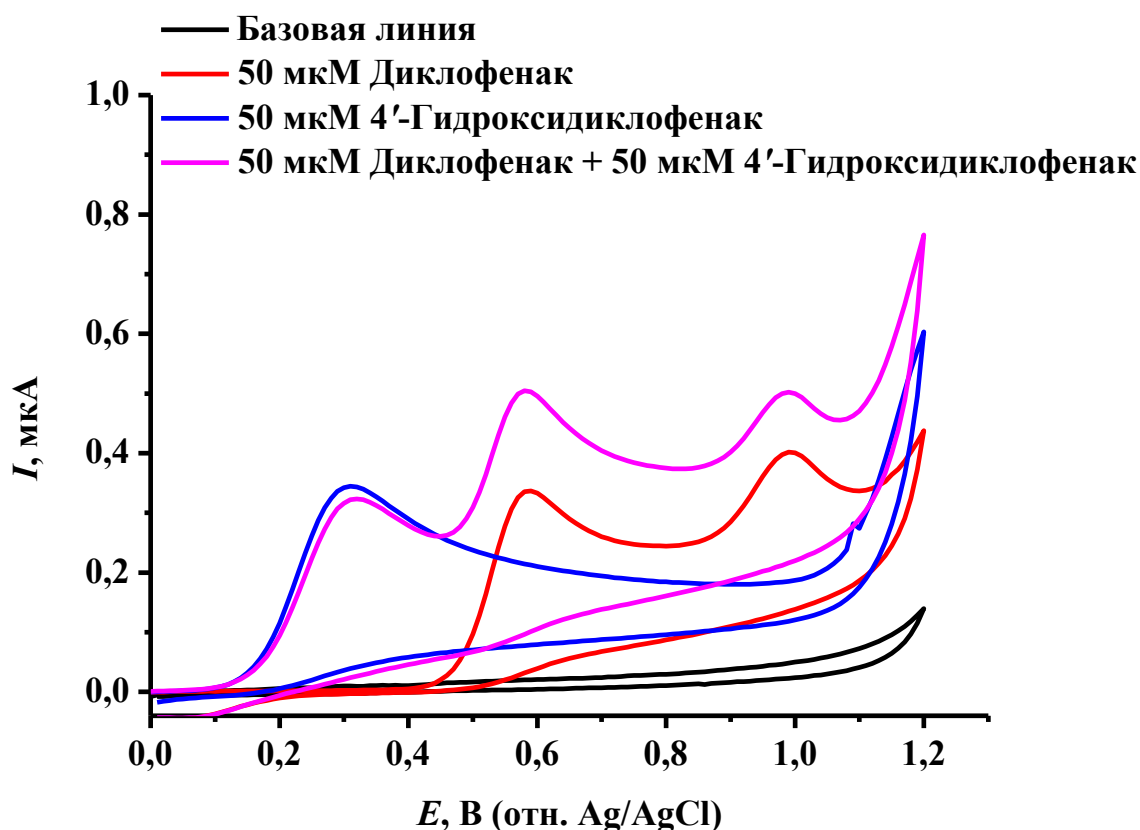


Рисунок 35. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол (—) и 50 мкМ диклофенак (—), 50 мкМ 4'-гидроксидиклофенак (—) или смесь 50 мкМ диклофенака и 50 мкМ 4'-гидроксидиклофенака (—). Скорость сканирования 100 мВ/с.

В данной области потенциалов для диклофенака были зарегистрированы два пика окисления – при $0,587 \pm 0,013$ В (отн. Ag/AgCl) и $0,992 \pm 0,015$ В (отн. Ag/AgCl). Пик в области 0,6 В (отн. Ag/AgCl), по-видимому, отражает процесс окисления диклофенака, протекающий по ранее установленному механизму при pH 7 [186] (рисунок 36).

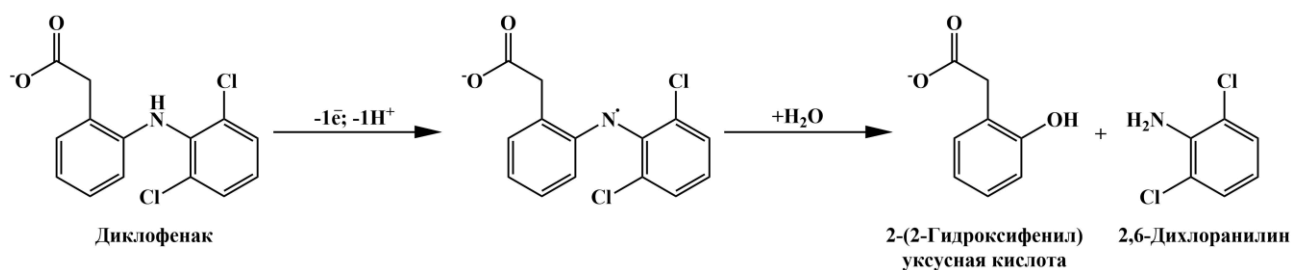


Рисунок 36. Предполагаемый механизм электрохимического окисления диклофенака [186].

В эквимольной смеси диклофенака и 4'-гидроксидиклофенака наблюдался пик окисления в области 0,3 В (отн. Ag/AgCl), аналогичный пику окисления 4'-гидроксидиклофенака, и пики в области 0,6 В (отн. Ag/AgCl) и 1 В (отн. Ag/AgCl), аналогичные пикам окисления диклофенака. Как показано на рисунке 36, в электрохимическом окислении диклофенака участвует иминогруппа. По-видимому, образующийся хинониминный продукт вследствие окисления 4'-гидроксидиклофенака не способен подвергаться дальнейшему окислению по механизму, характерному для диклофенака, о чем свидетельствует отсутствие пика окисления в области 0,6 В (отн. Ag/AgCl) и 1 В (отн. Ag/AgCl).

Таким образом, способность 4'-гидроксидиклофенака подвергаться электрохимическому окислению при потенциале, отличном от потенциалов окисления диклофенака, дает возможность их совместного определения в смеси.

Для разработки методики количественного определения 4'-гидроксидиклофенака мы использовали метод квадратно-волновой вольтамперометрии. Одним из эффективных способов увеличения чувствительности электрохимического анализа и снижения пределов определяемых концентраций аналитов является модификация электродов углеродными наноматериалами [258]. С целью повышения чувствительности электрохимического определения 4'-гидроксидиклофенака и снижения предела определяемых концентраций этого аналита для модификации рабочих электродов мы использовали водную дисперсию коммерчески доступных ОУНТ TUBALL™ ВАТТ Н₂О. На квадратно-волновых вольтамперограммах, зарегистрированных в

100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации 4'-гидроксидиклофенака (от 0,1 до 1 мкМ), с помощью электродов, модифицированных ОУНТ, мы наблюдали концентрационно-зависимые пики окисления в области $0,110 \pm 0,010$ В (отн. Ag/AgCl) (рисунок 37 А). При этом, на немодифицированных электродах регистрируются аналогичные концентрационно-зависимые пики, но с потенциалами окисления $0,275 \pm 0,025$ В (отн. Ag/AgCl) (рисунок 37 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 и их способность облегчать процесс электрохимического окисления 4'-гидроксидиклофенака. Ранее Salinas-Torres и соавт. регистрировали существенное смещение потенциалов окисления аскорбиновой кислоты, дофамина и гидрохинона на электродах, модифицированных ОУНТ, по сравнению с немодифицированными электродами, в сторону отрицательных значений вследствие каталитических свойств данного модификатора [259]. Аналогичное наблюдение было сделано Nabibi и соавт. при исследовании процессов окисления кодеина и кофеина [260]. Амплитуда пиков окисления 4'-гидроксидиклофенака как на модифицированных, так и на немодифицированных электродах линейно зависела от концентрации этого аналита (рисунки 37 Б и 37 Г, соответственно).

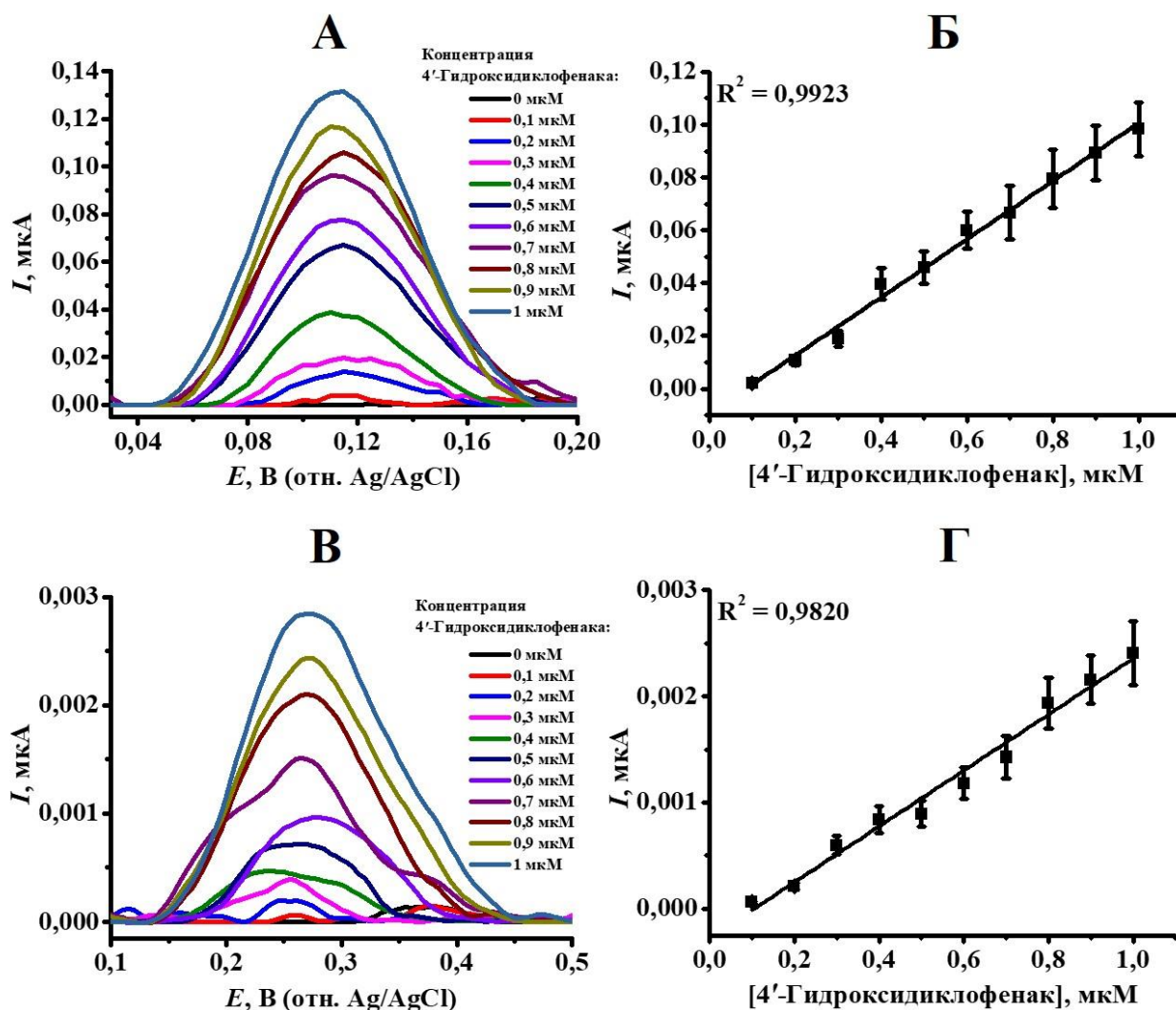


Рисунок 37. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированных ОУНТ (А), и немодифицированных ОУНТ (В) в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации 4'-гидроксидиклофенака (от 0 до 1 мкМ). Частота 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.

Зависимость амплитуды пика окисления от концентрации 4'-гидроксидиклофенака в случае использования электродов, модифицированных ОУНТ, описывалась уравнением вида: $I, \text{мкА} = (0,11004 \pm 0,00324), \text{мкА/мкМ} \times [4'\text{-Гидроксидиклофенак}], \text{мкМ} - (0,00938 \pm 0,00201), \text{мкА}$ ($R^2 = 0,9923$); и в случае

использования немодифицированных электродов: I , мкА = $(0,00263 \pm 0,00012)$, мкА/мкМ $\times$ [4'-Гидроксидиклофенак], мкМ – $(0,00028 \pm 0,00007)$, мкА ($R^2 = 0,9820$). Из полученных зависимостей были определены значения чувствительности, которые составили 0,11 мкА/мкМ и 0,003 мкА/мкМ – в случае использования модифицированных и немодифицированных электродов, соответственно. Значения предела определяемых концентраций были определены как 85 нМ в случае использования модифицированных и 120 нМ в случае использования немодифицированных электродов.

Таким образом, модификация электродов ОУНТ значительно улучшает как электрокаталитические свойства электродов, так и аналитические характеристики определения 4'-гидроксидиклофенака.

В дальнейшем, мы оценили применимость электрохимического определения 4'-гидроксидиклофенака для исследования каталитической активности СУР2С9, иммобилизованного на ПГЭ, модифицированных ДДАБ, по отношению к диклофенаку. Электрохимические свойства СУР2С9, иммобилизованного на ПГЭ, модифицированных ДДАБ, были определены методом циклической вольтамперометрии (рисунок 38). Циклическая вольтамперограмма СУР2С9, зарегистрированная в анаэробных условиях, характеризуется пиком восстановления при E_c $-0,383 \pm 0,010$ В (отн. Ag/AgCl) и пиком окисления при $-0,252 \pm 0,006$ В (отн. Ag/AgCl). Значение E_m составило $-0,318 \pm 0,010$ В (отн. Ag/AgCl). Значение ΔE рассчитано как 131 мВ. В соответствии с моделью Лавирона, значение k_s при скорости сканирования 100 мВ/с и α 0,5 было определено как $0,64 \pm 0,07$ с⁻¹. В соответствии с уравнением 10, количество электроактивного СУР2С9 на модифицированном электроде, потенциально способного участвовать в каталитическом процессе по отношению к диклофенаку, было определено как $0,18 \pm 0,02$ пмоль.

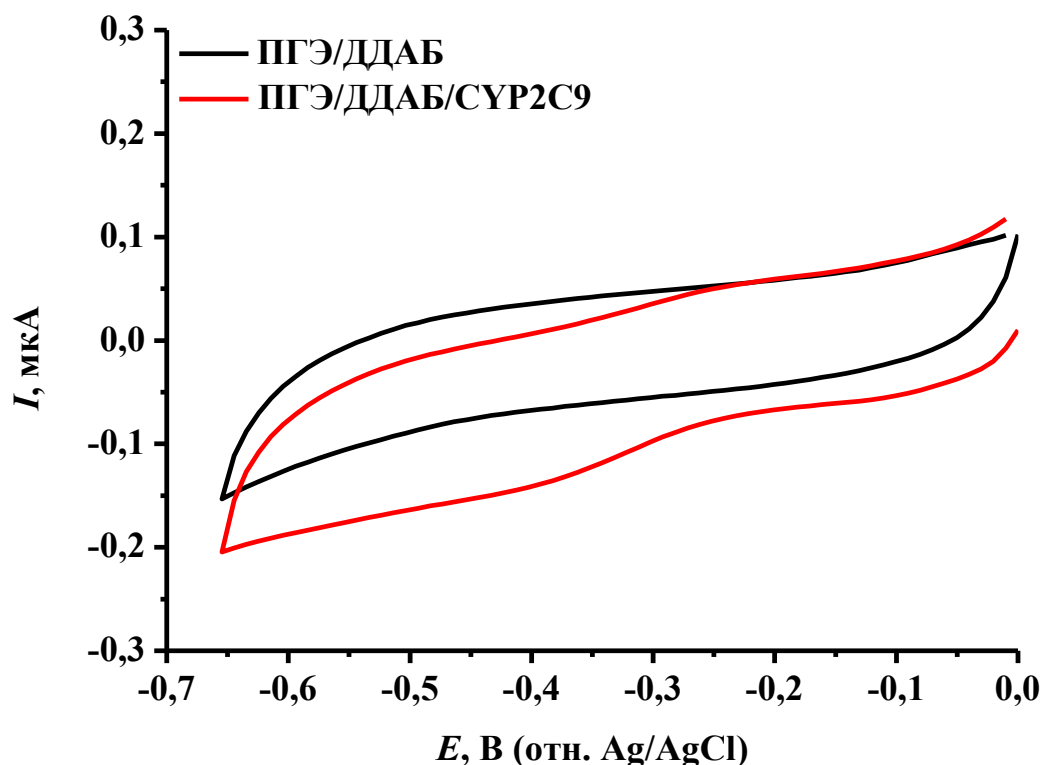


Рисунок 38. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ (—), и с иммобилизованным СΥΡ2С9 (—) в насыщенном аргоном 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl. Скорость сканирования 100 мВ/с.

Мы провели электрокаталитическую реакцию с СΥΡ2С9, 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. В качестве контроля электрокаталитическая реакция была проведена при тех же условиях и с той же концентрацией диклофенака с ПГЭ, модифицированным ДДАБ, но без фермента. После окончания электрокаталитической реакции мы сравнили амплитуды окислительных пиков, зарегистрированных с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии, в области, соответствующей электрохимическому окислению 4'-гидроксидиклофенака (рисунок 39).

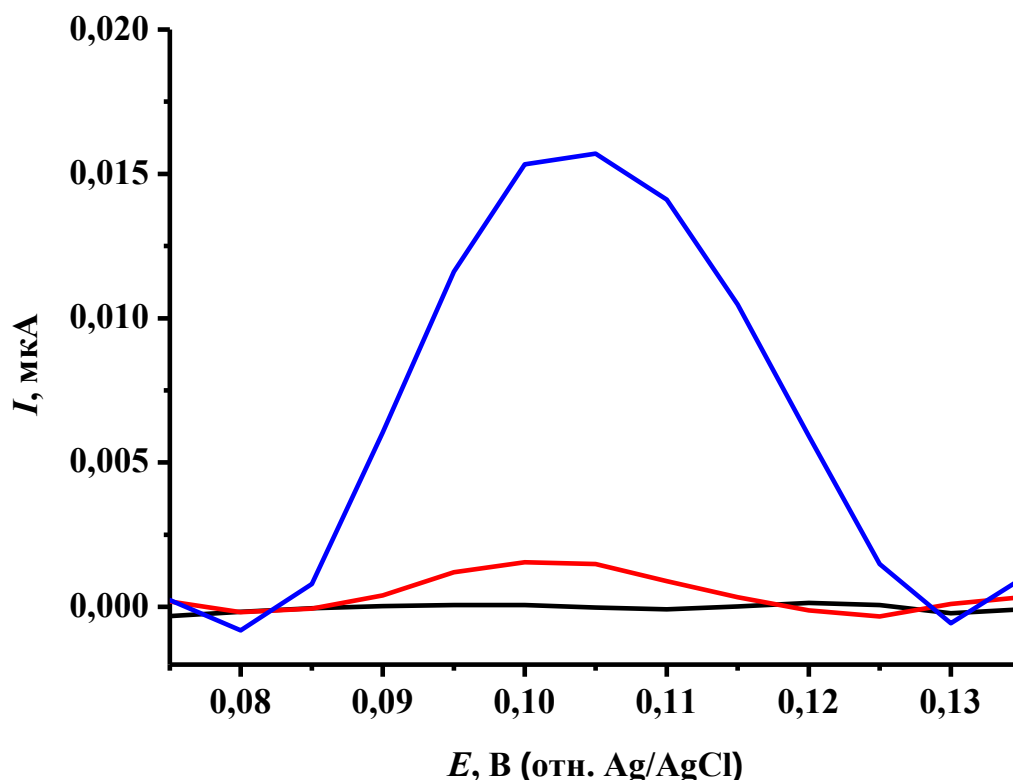


Рисунок 39. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированных ОУНТ, в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 100 мкМ диклофенак, до (—) или после проведения электрокаталитической реакции в течение 90 мин при фиксированном 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 39, после проведения электрокаталитической реакции с ферментным электродом регистрируется пик в области потенциалов, соответствующей окислению 4'-гидроксидиклофенака. Из калибровочной зависимости, представленной на рисунке 37 Б, мы определили количество образующегося 4'-гидроксидиклофенака, которое соответствовало V гидроксилирования диклофенака под действием СУР2С9 равной $4,74 \pm 0,42 \text{ мин}^{-1}$. Ранее V гидроксилирования диклофенака под действием исследуемого нами СУР2С9 при концентрации субстрата 100 мкМ была определена с помощью

реконструированной ферментативной системы как $4,25 \pm 1,66 \text{ мин}^{-1}$ [211]. Таким образом, полученное нами значение V гидроксилирования диклофенака под действием CYP2C9 в электрохимической системе хорошо согласуется со значением аналогичного параметра этого фермента, полученного с помощью альтернативной системы. В случае использования ПГЭ, модифицированного ДДАБ, но без фермента, после электрокаталитической реакции также регистрируется пик в области потенциалов окисления 4'-гидроксидиклофенака, но со значительно меньшей амплитудой, по сравнению с амплитудой тока, регистрируемой после проведения электрокаталитической реакции с ферментом. Поскольку до электрокаталитической реакции не наблюдалось пика в данной области потенциалов, мы предположили, что данный пик может свидетельствовать о наличии гидроксилированных по различным положениям ароматических колец производных диклофенака, образующихся под действием АФК, формирование которых обусловлено электрокаталитическим восстановлением кислорода. Таким образом, мы показали, что основной вклад в формирование 4'-гидроксидиклофенака в электрохимической системе вносит CYP2C9, иммобилизованный на электроде.

Следующим этапом работы было определение параметров стационарной кинетики CYP2C9 в электрохимической системе по отношению к диклофенаку. Мы определили значения начальных скоростей образования 4'-гидроксидиклофенака в электрохимической системе под действием CYP2C9 при различных концентрациях диклофенака (10-100 мкМ) (рисунок 40). Отметим, что при меньшей концентрации диклофенака образующийся в процессе ферментативной реакции 4'-гидроксидиклофенак не удается достоверно зафиксировать вследствие достижения предела определяемых концентраций. Зависимость начальной скорости CYP2C9-зависимого образования 4'-гидроксидиклофенака от концентрации диклофенака имела гиперболический характер ($R^2 = 0,9939$) и описывалась уравнением вида: $V, \text{ мин}^{-1} = ((5,3489 \pm 0,1253), \text{ мин}^{-1} \times [\text{Диклофенак}], \text{ мкМ}) / ((11,663 \pm 0,917), \text{ мкМ} + [\text{Диклофенак}], \text{ мкМ})$. Таким

образом, значение $V_{\max}$ было определено как $5,35 \pm 0,13 \text{ мин}^{-1}$, а значение K_M фермента по отношению к субстрату было определено как $11,66 \pm 0,92 \text{ мкМ}$.

Значение $V_{\max}/K_M$ СYP2C9 в электрохимической системе по отношению к диклофенаку рассчитано как $0,46 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$.

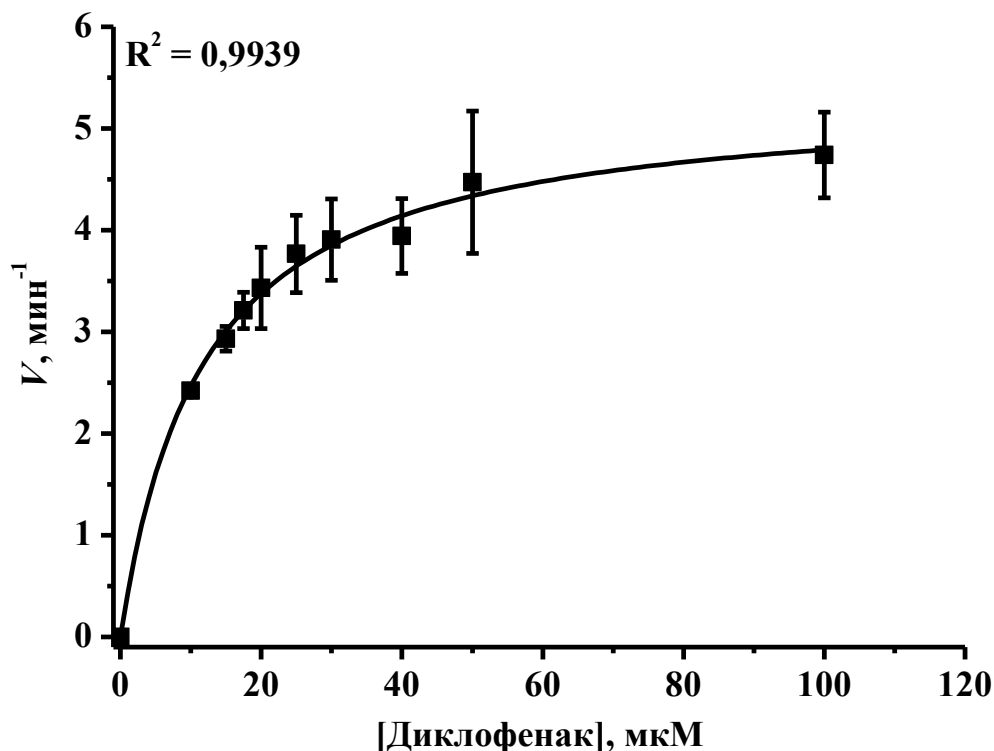


Рисунок 40. Зависимость начальной скорости СYP2C9-зависимого образования 4'-гидроксидиклофенака от концентрации диклофенака в электрохимической системе. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

Мы сравнили полученные нами с помощью электрохимической системы кинетические параметры СYP2C9 по отношению к диклофенаку с кинетическими параметрами, полученными с помощью других СYP2C9-содержащих ферментативных систем (таблица 3). Согласно данным других работ, значение $V_{\max}$ СYP2C9 по отношению к диклофенаку находится в широком диапазоне – $14,8\text{--}37,2 \text{ мин}^{-1}$ и превышает аналогичный параметр, полученный нами. Значение K_M находится в диапазоне $2,33\text{--}30 \text{ мкМ}$, таким образом, данный параметр

стационарной кинетики, полученный нами, укладывается в указанный диапазон. При этом значение $V_{\max}/K_M$ для электрохимической системы меньше данного значения, полученного с помощью других систем ($0,9-11,71 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$), что обусловлено вкладом $V_{\max}$, которая зависит, в том числе, и от условий проведения ферментативных реакций.

Таблица 3. Сравнение кинетических параметров CYP2C9 по отношению к диклофенаку, полученных с помощью различных ферментативных систем.

Ферментативная система	$V_{\max}, \text{мин}^{-1}$	$K_M, \text{мкМ}$	$V_{\max}/K_M, \text{мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$	Ссылка
Реконструированная	27 ± 1	30 ± 3	0,9	[261]
RECO®*	$16,8 \pm 0,9$	16 ± 2	1,1	[261]
Бакулосомы	29 ± 2	$5,1 \pm 0,9$	5,7	[261]
Суперсомы	$14,8 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,3$	5,7	[261]
Микросомы с CYP2C9 и CYP человека, коэкспрессированным и в дрожжах	$37,2 \pm 3,7$	$5,5 \pm 0,4$	$6,9 \pm 0,8$	[188]
Клетки COS-7, экспрессирующие CYP2C9	$27,15 \pm 0,94$	$2,33 \pm 0,17$	$11,71 \pm 0,56$	[147]
Электрохимическая	$5,35 \pm 0,13$	$11,66 \pm 0,92$	0,46	Данная работа

Примечание: *Коммерчески доступная смесь компонентов для реконструирования цитохром P450-содержащей системы.

Чтобы показать возможность применения разработанного нами подхода для исследования ингибиторов CYP2C9, мы использовали в качестве хорошо известного ингибитора этого изофермента цитохрома P450 сульфафеназол (4-

амино-N-(1-фенил-1*H*-пиразол-5-ил)бензолсульфонамид) [262, 263].

Предварительно мы исследовали электрохимическое окисление сульфafenазола на ПГЭ, модифицированных ОУНТ, методом квадратно-волновой вольтамперометрии (рисунок 41).

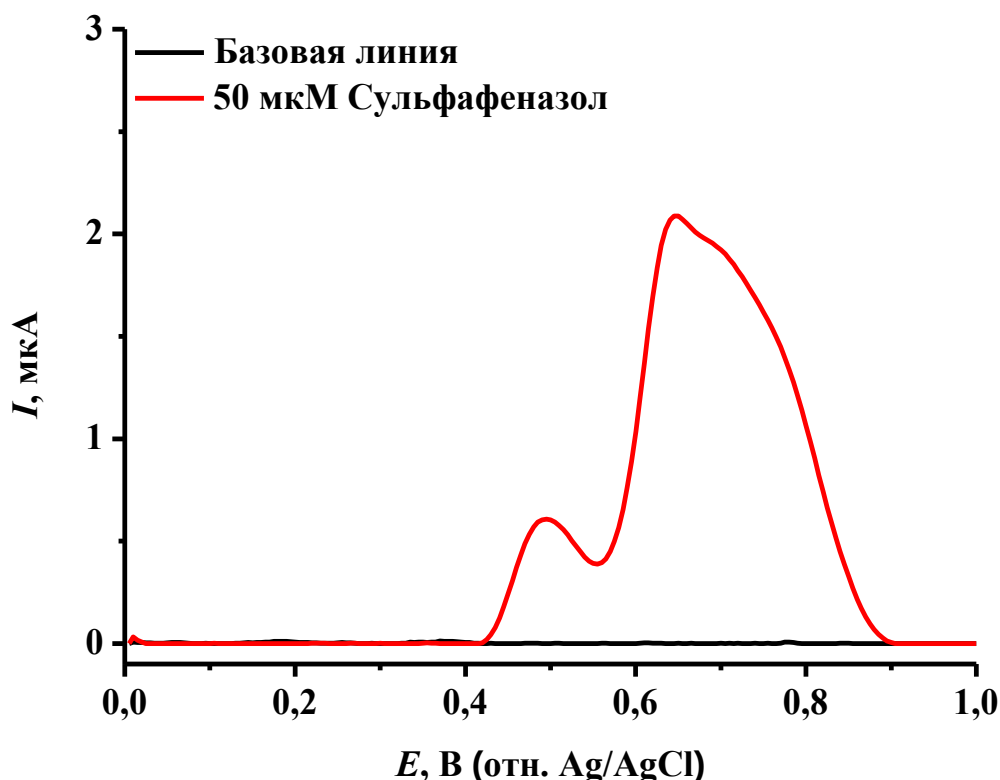


Рисунок 41. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированных ОУНТ, в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объёму) метанол (—) и 50 мкМ сульфafenазол (—). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ.

Квадратно-волновая вольтамперограмма сульфafenазола характеризуется пиком окисления в области 0,5 В (отн. Ag/AgCl) и двумя плохо разрешимыми пиками в области 0,65 В (отн. Ag/AgCl) и 0,7 В (отн. Ag/AgCl), соответственно. Таким образом, сульфafenазол не имеет пика электрохимического окисления в области 0,10-0,12 В (отн. Ag/AgCl), способного интерферировать с пиком

окисления 4'-гидроксидиклофенака и не мешает определению последнего при исследовании активности CYP2C9.

Для определения типа ингибирования CYP2C9 сульфafenазолом и константы ингибирования (K_i) мы использовали метод Диксона [264], в соответствии с которым определили обратные величины начальных скоростей 4'-гидроксилирования диклофенака при его концентрации, близкой к значению K_M (15 мкМ, 17,5 мкМ и 20 мкМ), в присутствии различных концентраций сульфafenазола (0 мкМ, 0,1 мкМ и 0,25 мкМ) (рисунок 42).

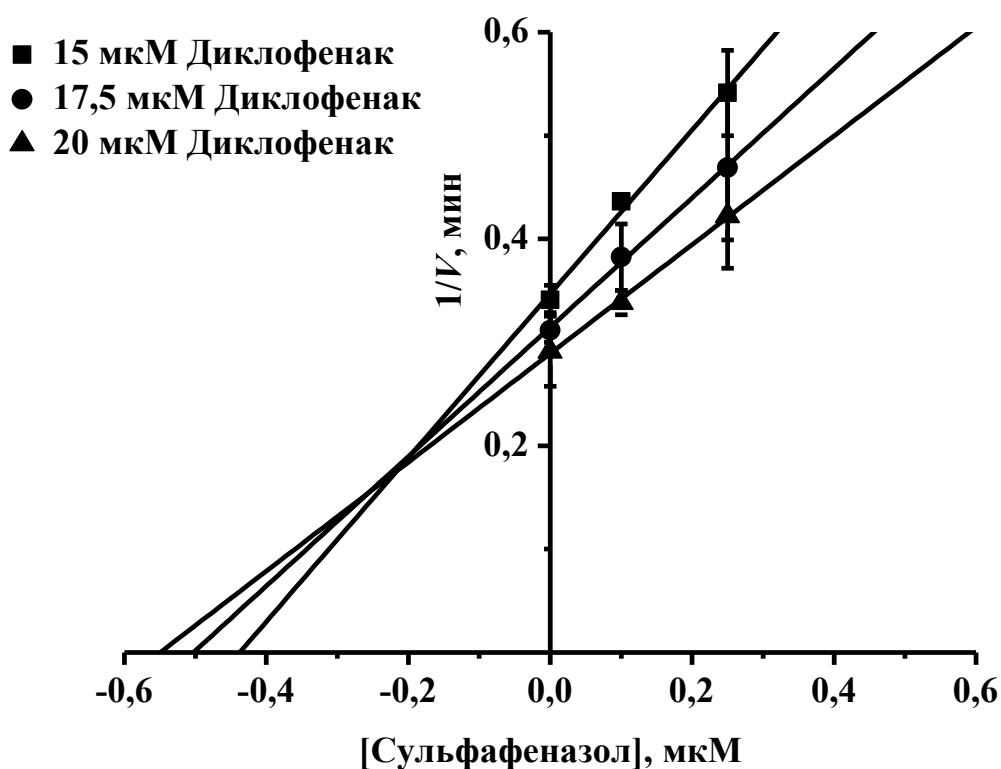


Рисунок 42. Зависимости обратных значений начальных скоростей CYP2C9-зависимого образования 4'-гидроксидиклофенака (при концентрациях диклофенака 15 мкМ (■), 17,5 мкМ (●) или 20 мкМ (▲)) от концентрации сульфafenазола в электрохимической системе. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

В присутствии различных концентраций сульфафеназола мы наблюдали концентрационно-зависимое снижение начальной скорости 4'-гидроксилирования диклофенака. Как видно на рисунке 42, зависимости обратных величин начальных скоростей 4'-гидроксилирования диклофенака от концентрации сульфафеназола линейны и имеют общую точку пересечения в отрицательной области над осью концентрации сульфафеназола. В соответствии с методом Диксона, данный характер зависимостей 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 сульфафеназол ингибирует 4'-гидроксилирование диклофенака по конкурентному типу, а значение K_i было определено как $0,11 \pm 0,08$ мкМ [265]. Следовательно, полученные нами параметры ингибирования сульфафеназолом активности CYP2C9 в электрохимической системе согласуются с аналогичными параметрами, полученными с помощью альтернативной ферментативной системы. Таким образом, разработанная электрохимическая система, основанная на электрохимическом определении 4'-гидроксидиклофенака, образующегося при участии иммобилизованного на электроде фермента, может применяться для выявления ингибиторов CYP2C9.

3.1.4. Биэлектродная электрохимическая система для определения каталитической активности CYP2C9 по отношению к (S)-напроксену

Наряду с реакциями ароматического гидроксилирования большое количество субстратов цитохромов P450, содержащих ароматические группы, подвергается реакциям деалкилирования за счет окисления алкильных групп с последующим их отщеплением и образованием гидроксифенильных групп в составе метаболитов. При этом, образующиеся метаболиты с гидроксифенильной группой способны электрохимически окисляться при потенциалах, отличных от потенциалов окисления исходных субстратов. Электрохимический мониторинг образования продуктов, содержащих гидроксифенильные группы, образующихся в

результате реакций деалкилирования субстратов, может лежать в основе метода определения активности ряда цитохромов P450. Субстратами цитохромов P450, подвергающимися реакциям О-деалкилирования с образованием продуктов, содержащих гидроксифенильные группы, являются отдельные представители НПВС, антидепрессантов, противоопухолевых соединений, наркотических анальгетиков, антиаритмических и антигистаминных соединений, ингибиторов холинэстеразы [139]. Одним из таких препаратов является НПВС напроксен (6-метокси- α -метил-2-нафталенуксусная кислота), ингибирующий циклооксигеназу 1 и 2 [266].

В работах Rodrigues и соавт. [267], Miners и соавт. [268] и Трасу и соавт. [269] было показано, что напроксен подвергается метаболизму главным образом при участии цитохрома P450 1A2 (CYP1A2) и цитохрома P450 2C9 (CYP2C9) (рисунок 43).

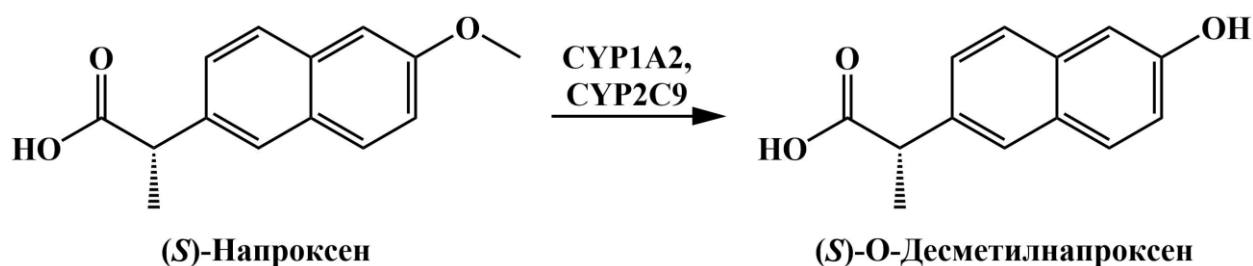


Рисунок 43. Реакция О-деметиляции (S)-напроксена при участии CYP1A2 и CYP2C9.

Напроксен может быть использован как субстрат для определения активности рекомбинантного CYP2C9 [270].

Мы предположили, что способность (S)-напроксена и продукта его биотрансформации (S)-О-десметилнапроксена электрохимически окисляться при различных потенциалах может лежать в основе подхода для определения О-деметиلاзной активности CYP2C9, иммобилизованного на электроде.

Электрохимические свойства (S)-напроксена и (S)-О-десметилнапроксена были изучены нами методом циклической вольтамперометрии (рисунок 44 А).

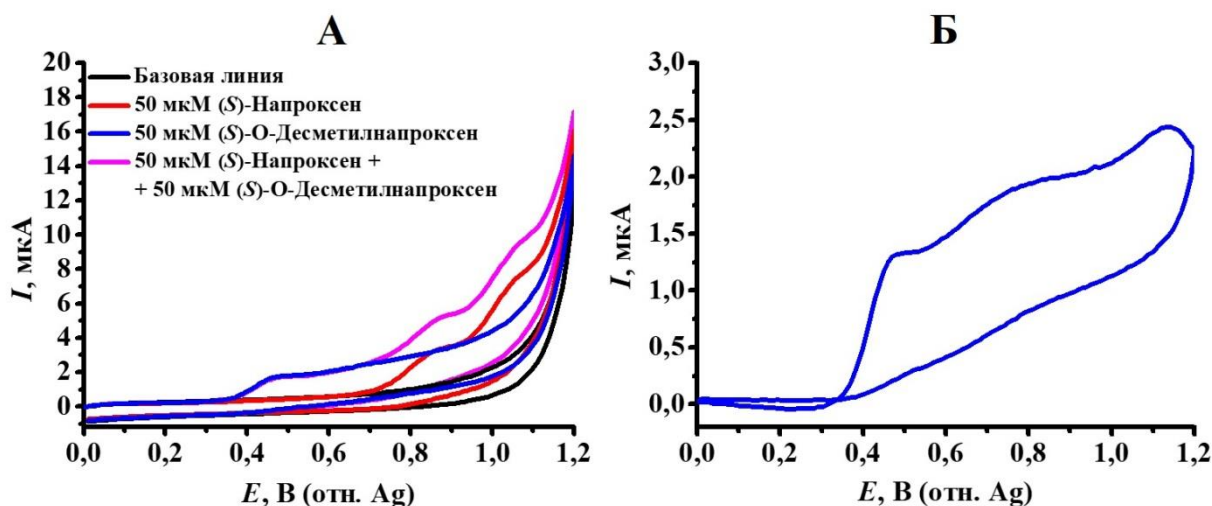


Рисунок 44. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4) содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол (—) и 50 мкМ (S)-напроксен (—), 50 мкМ (S)-О-десметилнапроксен (—) или смесь 50 мкМ (S)-напроксена и 50 мкМ (S)-О-десметилнапроксена (—), (А) и циклическая вольтамперограмма, полученная в результате вычитания базовой линии из циклической вольтамперограммы, зарегистрированной в буфере того же состава, содержащем 50 мкМ (S)-О-десметилнапроксен (Б). Скорость сканирования 100 мВ/с.

Как видно на рисунке 44 А, в диапазоне потенциалов от 0 до 1,2 В (отн. Ag) циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 50 мкМ (S)-напроксен, характеризуется наличием двух пиков окисления: в области 0,850 В (отн. Ag) и 1,035 В (отн. Ag). Ранее схожие электрохимические характеристики для напроксена были получены Qian и соавт. с помощью СУЭ в 100 мМ фосфатном буфере при рН 7,2 [271]. Первый пик характеризует процесс окисления карбоксильной группы напроксена до катион-радикала, а второй соответствует дальнейшему окислению напроксена до 2-ацетил-6-метокси-нафталина [271, 272]. Циклическая вольтамперограмма 50 мкМ (S)-О-десметилнапроксена характеризовалась наличием пика окисления в области 0,475 В (отн. Ag), переходящего во второй нечетко визуализируемый пик окисления с максимумом

около 0,750 В (отн. Ag). Чтобы получить разрешимые пики окисления (S)-О-десметилнапроксена, мы провели вычитание фоновой циклической вольтамперограммы, зарегистрированной в буфере, не содержащем (S)-О-десметилнапроксен, из циклической вольтамперограммы, зарегистрированной в буфере, содержащем 50 мкМ (S)-О-десметилнапроксен (рисунок 44 Б). После вычитания на результирующей циклической вольтамперограмме были зарегистрированы три разрешимых пика окисления с потенциалами в области 0,492 В (отн. Ag), 0,762 В (отн. Ag) и 1,129 В (отн. Ag). По-видимому, первый пик соответствует процессу окисления гидроксифенильной группы (S)-О-десметилнапроксена, а второй и третий пики – процессу окисления карбоксильной группы, аналогичному для (S)-напроксена. Поскольку в основе химического строения (S)-О-десметилнапроксена лежит бета-нафтол, можно предположить, что окисление гидроксифенильной группы (S)-О-десметилнапроксена протекает по механизму, схожему с механизмом электрохимического окисления гидроксильной группы у бета-нафтола [273-276]. Циклическая вольтамперограмма эквимольярной смеси (S)-напроксена (50 мкМ) и (S)-О-десметилнапроксена (50 мкМ) характеризовалась тремя пиками окисления в области 0,475 В (отн. Ag), 0,870 В (отн. Ag) и 1,035 В (отн. Ag), соответствующими процессам окисления (S)-О-десметилнапроксена и (S)-напроксена, описанным выше. Таким образом, нами было показано, что (S)-О-десметилнапроксен в смеси с (S)-напроксом может быть идентифицирован по пику электрохимического окисления гидроксифенильной группы, содержащейся в его структуре.

Для разработки методики количественного определения (S)-О-десметилнапроксена нами использовался метод квадратно-волновой вольтамперометрии. Потенциал первого пика окисления (S)-О-десметилнапроксена при его концентрации 0,3-1 мкМ регистрировался при $0,400 \pm 0,020$ В (отн. Ag) (рисунок 45 А). Нами была получена калибровочная зависимость тока окисления (S)-О-десметилнапроксена от концентрации этого соединения в диапазоне 0,3-1 мкМ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и 1% (по объему) метанол (рисунок 45 Б).

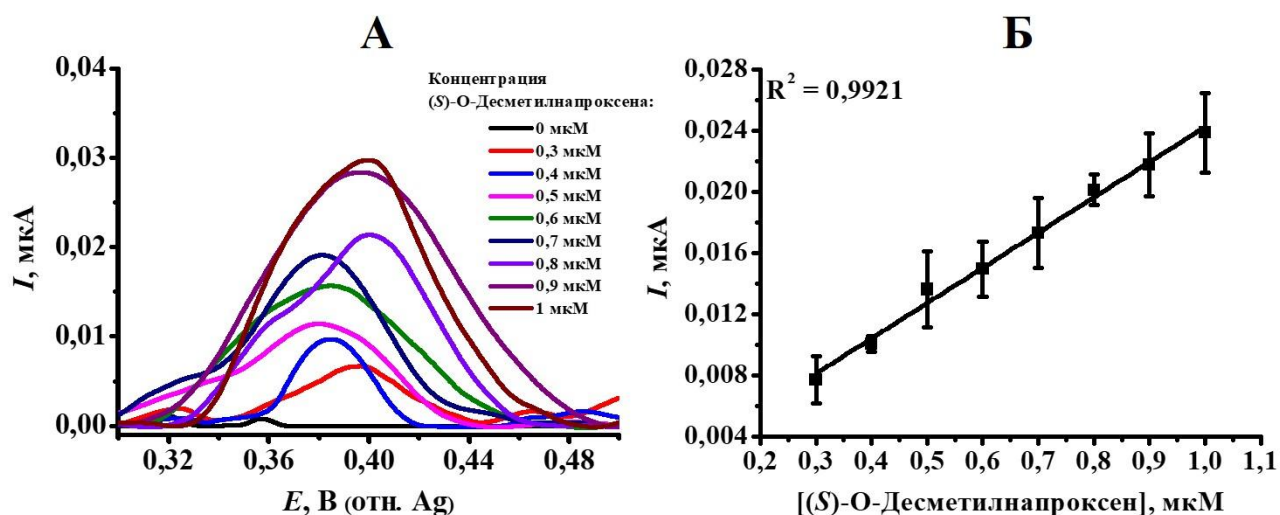


Рисунок 45. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации (S)-О-десметилнапроксена (от 0 до 1 мкМ) (А). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ. Зависимость тока пика окисления от концентрации (S)-О-десметилнапроксена (Б). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

Как видно на рисунке 45 Б, зависимость тока окисления (S)-О-десметилнапроксена от концентрации этого соединения имеет линейный характер ($R^2 = 0,9921$) и описывается уравнением: $I, \text{ мкА} = (0,02305 \pm 0,00078), \text{ мкА/мкМ} \times [(S)\text{-О-десметилнапроксен}], \text{ мкМ} + (0,00118 \pm 0,00053), \text{ мкА}$. Чувствительность определения (S)-О-десметилнапроксена составила 0,023 мкА/мкМ. Предел определяемых концентраций (S)-О-десметилнапроксена, рассчитанный с учетом трехкратного стандартного отклонения среднего значения тока в области потенциала окисления (S)-О-десметилнапроксена, был определен как 290 нМ.

Мы оценили возможность кинетического анализа О-деметиلاзной активности CYP2C9, иммобилизованного на ПГЭ, модифицированного ДДАБ, по отношению к (S)-напроксену путем электрохимического определения образующегося (S)-О-десметилнапроксена. Редокс-процесс CYP2C9, иммобилизованного на электроде, был охарактеризован методом циклической

вольтамперометрии в анаэробных условиях в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, насыщенном аргонem (рисунок 46 А). После вычитания циклической вольтамперограммы, зарегистрированной для ПГЭ, модифицированного ДДАБ, без фермента из циклической вольтамперограммы ПГЭ, модифицированного ДДАБ, с иммобилизованным ферментом регистрируются два пика: соответствующий восстановлению иона железа гема фермента при $E_c -0,358 \pm 0,007$ В (отн. Ag) и окислению иона железа гема при $E_a -0,242 \pm 0,008$ В (отн. Ag) (рисунок 46 Б). Значение E_m было определено как $-0,300 \pm 0,015$ В (отн. Ag). Значение ΔE рассчитано как 116 мВ. В соответствии с моделью Лавирона, значение k_s при скорости сканирования 100 мВ/с и α 0,5 было определено как $0,8 \pm 0,1$ с⁻¹. Количество электроактивного СУР2С9, потенциально способного участвовать в каталитической реакции, было определено из циклических вольтамперограмм в соответствии с уравнением 10 и составило $9,4 \pm 0,3$ пмоль.

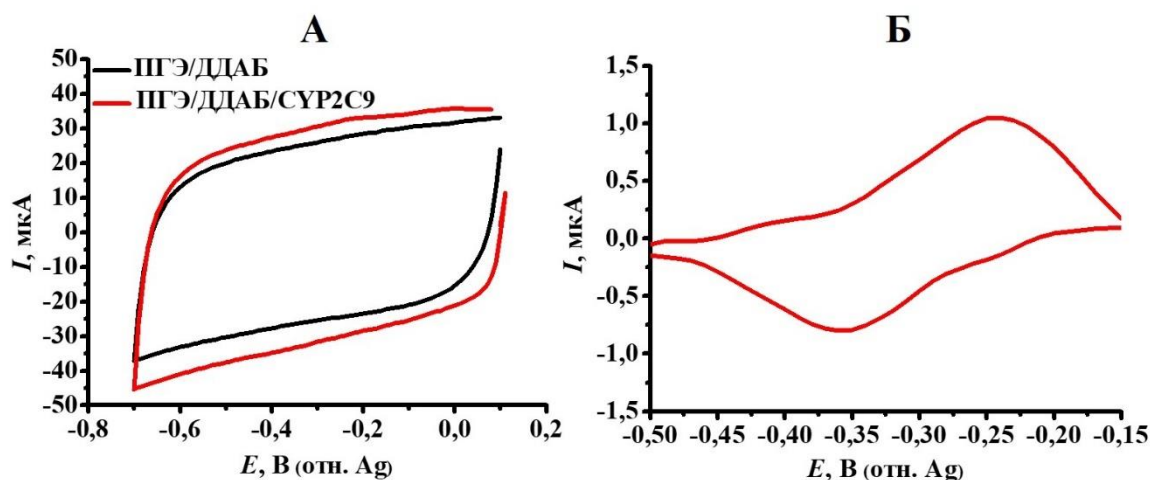


Рисунок 46. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ (—), и с иммобилизованным СУР2С9 (—) в насыщенном аргонem 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, (А) и циклическая вольтамперограмма, полученная после вычитания циклической вольтамперограммы ПГЭ, модифицированного ДДАБ, без фермента из циклической вольтамперограммы ПГЭ, модифицированного ДДАБ, с иммобилизованным ферментом (Б). Скорость сканирования 100 мВ/с.

Далее мы исследовали активность СУР2С9, иммобилизованного на электроде, по отношению к 1500 мкМ (S)-напроксену путем электрохимической регистрации образующегося (S)-О-десметилнапроксена. СУР2С9-зависимая электрокаталитическая реакция проводилась в течение 60 мин при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,550 В (отн. Ag) в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и 1% (по объему) метанол (рисунок 47). В качестве контрольного эксперимента мы провели электрокаталитическую реакцию в присутствии 1500 мкМ (S)-напроксена при аналогичных условиях с электродом, модифицированным ДДАБ, но без иммобилизованного фермента.

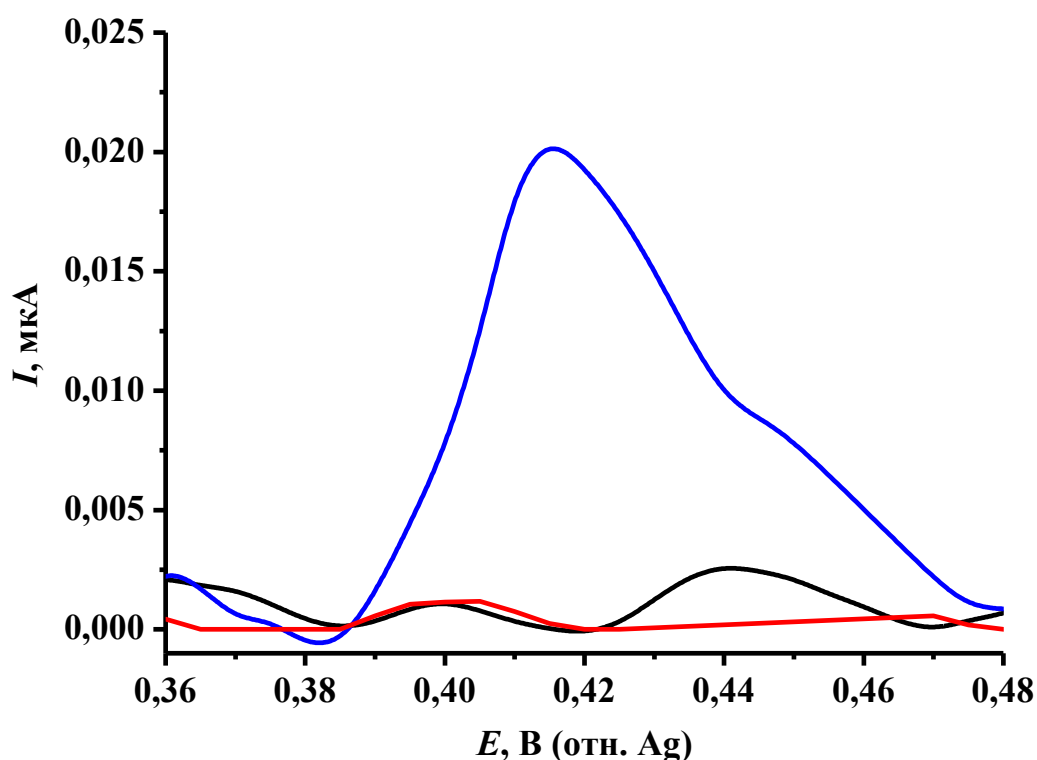


Рисунок 47. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 1500 мкМ (S)-напроксен, до (—) или после проведения электрокаталитической реакции в течение 60 мин при фиксированном потенциале -0,550 В (отн. Ag) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ (—) и с иммобилизованным СУР2С9 (—). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ.

Как видно на рисунке 47, после проведения электрокаталитической реакции с иммобилизованным на электроде CYP2C9 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 CYP2C9, иммобилизованного на электроде, в образование (S)-О-десметилнапроксена. V О-деметилования (S)-напроксена (1500 мкМ) под действием CYP2C9 с учетом количества электроактивного фермента на электроде была определена как $0,79 \pm 0,14 \text{ мин}^{-1}$.

Для определения параметров стационарной кинетики CYP2C9 по отношению к (S)-напроксену была определена начальная скорость реакции О-деметилования при концентрации (S)-напроксена 200-1500 мкМ (рисунок 48 А). Зависимость начальной скорости реакции О-деметилования (S)-напроксена от концентрации (S)-напроксена имела гиперболический характер ($R^2 = 0,9951$) и описывалась уравнением вида: $V, \text{ мин}^{-1} = ((0,9778 \pm 0,0281), \text{ мин}^{-1} \times [(S)\text{-Напроксен}], \text{ мкМ}) / ((330,8852 \pm 30,2268), \text{ мкМ} + [(S)\text{-Напроксен}], \text{ мкМ})$. Таким образом, значение V_{max} было определено как $0,98 \pm 0,03 \text{ мин}^{-1}$, а значение K_M – $331 \pm 30 \text{ мкМ}$. Значение каталитической эффективности (V_{max}/K_M) рассчитано как $0,003 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$.

Детальное изучение кинетики метаболизма напроксена в работах Korzekwa и соавт. [277], Tracy и соавт. [192], Hummel и соавт. [278] и Kumar и соавт. [279]

показало, что зависимость начальной скорости CYP2C9-зависимого O-деметилирования напроксена от его концентрации (кинетический профиль) имеет бифазный характер, свидетельствующий об одновременном взаимодействии двух молекул субстрата с активным центром фермента с различными значениями $V_{\max}$ и K_M . С другой стороны, в работе Henderson и соавт. при исследовании O-деметилазной активности CYP2C9 по отношению к (S)-напроксену с помощью суперсом были определены кинетические параметры фермента в соответствии с моделью Михаэлиса-Ментен: $V_{\max} = 31,7 \pm 2,5 \text{ мин}^{-1}$, $K_M = 280 \pm 8,9 \text{ мкМ}$ и $V_{\max}/K_M = 0,11 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$ [280]. Также в работе McDonald и соавт. с помощью CYP2C9-реконструированной системы были определены значения $V_{\max}$ и K_M фермента по отношению к напроксену как $15,3 \pm 0,72 \text{ пмоль/мин/пмоль}$ и $419 \pm 59 \text{ мкМ}$, соответственно, при этом авторы не отмечали, что кинетический профиль фермента характеризовался бифазным характером [281]. В работе McGinnity и соавт. была исследована активность микросом, полученных из В-лимфобластоидных клеток человека, коэкспрессирующих рекомбинантный CYP2C9 человека и цитохром P450 редуктазу человека, а также CYP2C9 человека, коэкспрессированного с цитохром P450 редуктазой человека в *Escherichia coli* [270]. Значения $V_{\max}$ CYP2C9 в соответствующих системах были определены как $4,9 \text{ мин}^{-1}$ и $6,7 \pm 0,9 \text{ мин}^{-1}$, а значения $K_M = 116 \text{ мкМ}$ и $307 \pm 65 \text{ мкМ}$, соответственно.

Для подтверждения кинетики Михаэлиса-Ментен, описывающей биотрансформацию (S)-напроксена в электрохимической системе при участии CYP2C9, мы провели линеаризацию зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата, в соответствии с методом линеаризации в координатах Иди-Хофсти (V от $V/[S]$). Методы математического преобразования зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата часто применяются в качестве диагностического критерия для подтверждения отклонения от кинетической модели Михаэлиса-Ментен [282]. В соответствии с методом Иди-Хофсти, зависимость в координатах V от $V/[S]$ является прямой и описывается уравнением 22 в случае гиперболической зависимости начальной скорости реакции

от концентрации субстрата, т.е. протекания реакции в соответствии с моделью Михаэлиса-Ментен [283]:

$$V = V_{\max} - K_M \frac{V}{[S]}. \quad (22)$$

Таким образом, полученная зависимость V от $V/[S]$ имела линейный характер ($R^2 = 0,9463$), свидетельствующий о монофазном кинетическом профиле, то есть связывании одной молекулы субстрата с активным центром фермента (рисунок 48 Б).

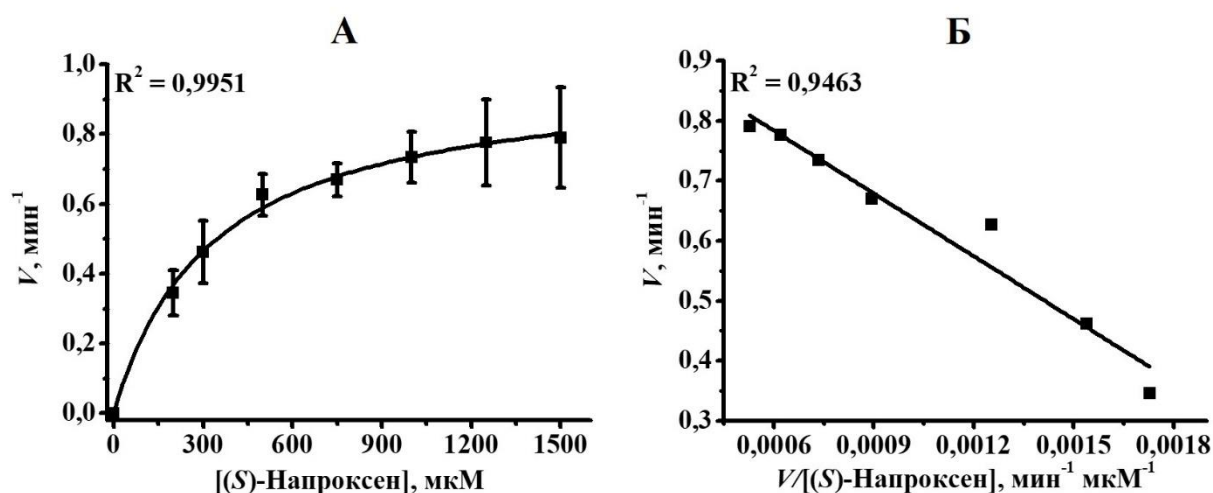


Рисунок 48. Зависимость начальной скорости CYP2C9-зависимого образования (S)-О-десметилнапроксена от концентрации (S)-напроксена в электрохимической системе (А) и зависимость V от $V/[S]$ (координаты Иди-Хофсти) (Б). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

Стоит отметить низкое значение $V_{\max}$ CYP2C9 по отношению к (S)-напроксену, полученное с помощью электрохимической системы, по сравнению с аналогичным параметром стационарной кинетики, полученным в работах, упомянутых выше. Это может быть связано с менее выгодной для взаимодействия с (S)-напроксеном конформацией фермента, иммобилизованного на электроде, по сравнению с конформацией CYP2C9 в растворе. При этом значение K_M CYP2C9 по отношению к (S)-напроксену в электрохимической системе сопоставимо с

аналогичным параметром, полученным с помощью других ферментативных систем.

Таким образом, разработана электрохимическая система для определения О-деметилазной активности CYP2C9 по отношению к (S)-напроксену.

3.1.5. Электрохимическая система для определения каталитической активности CYP2C19 по отношению к фенитоину

Хорошо известно, что иммобилизация ферментов может приводить к изменению их кинетических параметров, субстратной специфичности и других характеристик фермента вследствие его структурных изменений или изменений физико-химических свойств матрицы, используемой для иммобилизации [70, 71]. Для полноценного и стабильного функционирования цитохромов P450 в иммобилизованном состоянии, в том числе в электрохимических системах, необходимо учитывать особенности этих ферментов, поскольку только правильная конформация и ориентация на матрице способствуют доступу к активному центру субстрата и кислорода (как косубстрата реакции), а также высвобождению продукта реакции [71]. Использование *in vitro* систем, в том числе электрохимических, позволяет смоделировать цитохром P450-зависимый метаболизм лекарственных препаратов. Корреляция между клиренсами *in vitro* и *in vivo* позволяет спрогнозировать фармакокинетику и оценить дозировку препарата, что особенно важно при исследовании новых соединений [284]. Применение неточных моделей вследствие ошибочного восприятия отклонения от модели Михаэлиса-Ментен как экспериментального артефакта при исследовании кинетических профилей цитохром P450-зависимого метаболизма лекарственных препаратов приводит к неточностям в оценке фармакокинетики лекарственного препарата [284, 285]. Хорошо известно, что метаболизм ряда субстратов цитохромов P450 характеризуется отклонением от гиперболического характера зависимости начальных скоростей реакции от концентрации субстрата (модели

Михаэлиса-Ментен), при этом регистрируемые атипичные кинетические профили выделяют в пять категорий: активация, автоактивация, ингибирование субстратом, частичное ингибирование и бифазный метаболизм [277, 286]. Однако атипичный характер зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата может быть и артефактом, возникающим при значительном истощении субстрата, неспецифическом связывании субстрата компонентами инкубационной среды, активацией клеточных транспортных систем, недостаточной аналитической чувствительности, низкой растворимости субстрата, использовании неподходящих буферов, превышении допустимого уровня органических растворителей и использовании мультиферментных систем (таких как микросомы печени человека), а также в случае отсутствия в системе Co^{2+} , необходимого для нормального функционирования ряда изоферментов цитохрома P450 [284, 286].

Фенитоин – широко используемый противосудорожный препарат, участвующий в большом количестве межлекарственных взаимодействий [287]. В большей степени метаболизм фенитоина осуществляется путем 4-гидроксилирования за счет CYP2C9 и в меньшей степени за счет CYP2C19 [287, 288] (рисунок 49). Фенитоин зачастую назначается в качестве одного из компонентов комплексной терапии эпилепсии, таким образом, представляет значительный интерес исследование межлекарственных взаимодействий как в случае его применения с другими противосудорожными препаратами, так и с лекарственными препаратами, принадлежащими к другим фармакологическим группам [289].

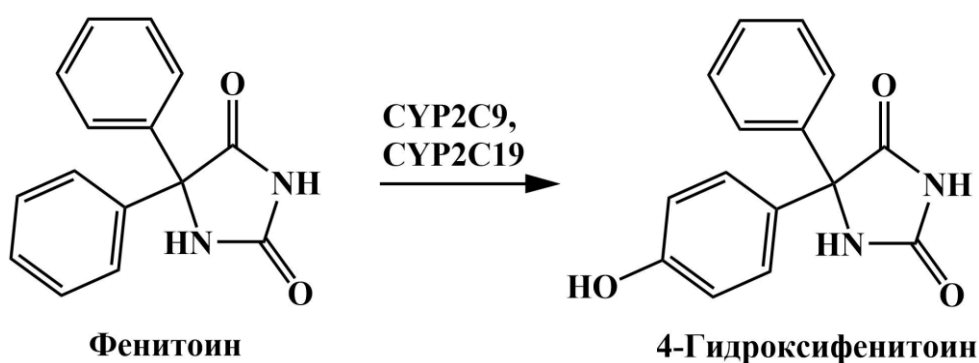


Рисунок 49. Реакция 4-гидроксилирования фенитоина при участии CYP2C9 и CYP2C19.

Ранее отмечалось, что метаболизм фенитоина в микросомальной системе с гиперэкспрессированным 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 [288].

В данной части работы мы оценили возможность применения электрохимической системы на основе иммобилизованных на электроде форм цитохрома P450 для выявления атипичных кинетических профилей биотрансформации лекарственных препаратов на примере реакции ароматического гидроксилирования фенитоина при участии CYP2C19. С этой целью нами была разработана методика количественного электрохимического определения 4-гидроксифенитоина, образующегося при участии иммобилизованного на электроде CYP2C19.

Мы предположили, что электрохимические свойства 4-гидроксифенитоина за счет гидроксифенильной группы в его структуре могут существенно отличаться от электрохимических свойств фенитоина, что может быть использовано для мониторинга образования 4-гидроксифенитоина в процессе ферментативной реакции. Электрохимические свойства фенитоина, 4-гидроксифенитоина и эквимольной смеси этих соединений были изучены нами методом циклической вольтамперометрии на немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и 1% (по объему) метанол (рисунок 50).

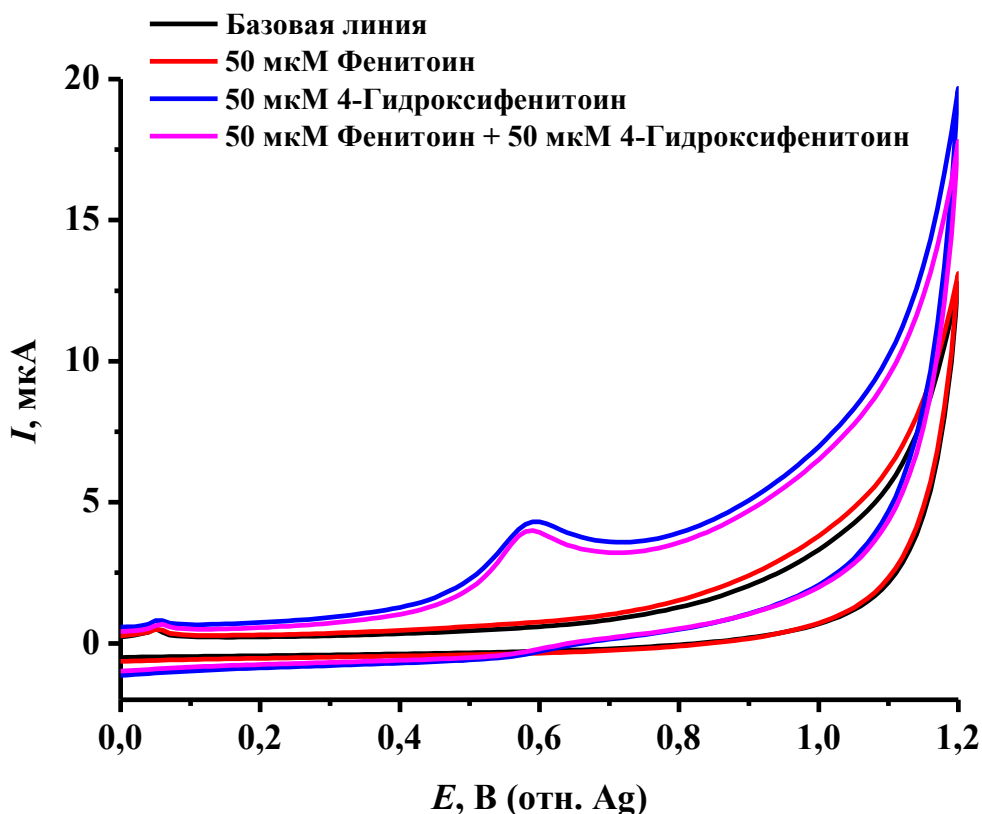


Рисунок 50. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол (—) и 50 мкМ фенитоин (—), 50 мкМ 4-гидроксифенитоин (—) или смесь 50 мкМ фенитоина и 50 мкМ 4-гидроксифенитоина (—). Скорость сканирования 100 мВ/с.

Как видно на рисунке 50, циклическая вольтамперограмма в диапазоне от 0 до 1,2 В (отн. Ag) для 50 мкМ фенитоина характеризуется отсутствием пиков окисления и восстановления, при этом характер кривой слабо отличается от базовой линии, зарегистрированной в буфере, не содержащем фенитоина. Ранее было показано, что фенитоин способен подвергаться прямому электрохимическому окислению на золотом электроде в 50 мМ NaHCO_3 , при этом в механизме электрохимического окисления участвует имино группа в первом положении гидантоинового фрагмента молекулы фенитоина [290]. Циклическая вольтамперограмма 4-гидроксифенитоина в указанной области потенциалов характеризуется наличием пика окисления при 0,595 В (отн. Ag). Поскольку 4-

гидроксифенитоин отличается от фенитоина наличием гидроксифенильной группы, очевидно, что единственный пик окисления в данном диапазоне потенциалов свидетельствует о вкладе в процесс окисления именно этой функциональной группы. В эквимольной смеси фенитоина и 4-гидроксифенитоина регистрируется единственный пик окисления со значениями потенциала и тока, характерными для окисления 4-гидроксифенитоина. Таким образом, различия в электрохимических свойствах фенитоина и 4-гидроксифенитоина обусловлены наличием у последнего гидроксифенильной группы. Различия в электрохимических свойствах этих соединений могут лежать в основе количественного определения 4-гидроксифенитоина по характеристическому пику его окисления при проведении кинетических исследований ферментов, участвующих в биотрансформации фенитоина, без разделения реакционной смеси, содержащей одновременно субстрат и продукт реакции.

Для количественного определения 4-гидроксифенитоина мы использовали метод квадратно-волновой вольтамперометрии (рисунок 51 А). Данным методом был зарегистрирован пик окисления 4-гидроксифенитоина при $0,602 \pm 0,018$ В (отн. Ag). Зависимость тока пика окисления 4-гидроксифенитоина от концентрации этого соединения (от 0,1 до 1 мкМ) в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и 1% (по объему) метанол, имела линейный характер ($R^2 = 0,9913$) и описывалась уравнением вида: I , мкА = $(0,06215 \pm 0,00194)$, мкА/мкМ $\times$ ([4-Гидроксифенитоин], мкМ – $(0,00069 \pm 0,00121)$, мкА (рисунок 51 Б). Чувствительность была определена как 0,062 мкА/мкМ. Предел определяемых концентраций, рассчитанный с учетом трехкратного стандартного отклонения средней величины тока в области 0,6 В (отн. Ag), регистрируемого в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и 1% (по объему) метанол и не содержащем 4-гидроксифенитоин, был определен как 40 нМ.

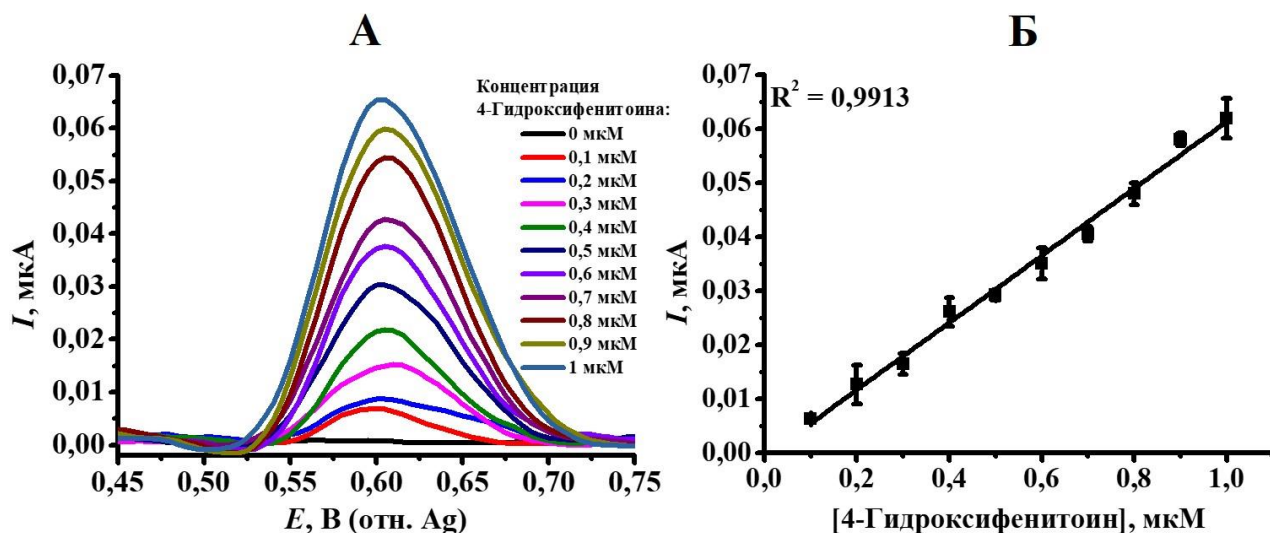


Рисунок 51. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации (от 0 до 1 мкМ) 4-гидроксифенитоина (А). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ. Зависимость тока пика окисления от концентрации 4-гидроксифенитоина (Б). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

Разработанная методика количественного электрохимического определения 4-гидроксифенитоина применялась нами для исследования каталитической активности CYP2C19, иммобилизованного на ПГЭ, модифицированных ДДАБ.

Иммобилизованный на электроде CYP2C19 был охарактеризован методом циклической вольтамперометрии в насыщенном аргоном 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl (анаэробные условия) при скорости сканирования 100 мВ/с (рисунок 52 А). После вычитания фоновой кривой, на разностной циклической вольтамперограмме электрода, модифицированного ДДАБ, с иммобилизованным CYP2C19 регистрируются два пика: при $E_c -0,286 \pm 0,004$ В (отн. Ag), соответствующий восстановлению иона железа гема фермента, и при $E_a -0,230 \pm 0$ В (отн. Ag), соответствующий окислению иона железа гема фермента (рисунок 52 Б). Значение E_m определено как $-0,258 \pm$

0,004 В (отн. Ag), а ΔE – 56 мВ. В соответствии с моделью Лавирона, значение k_s при скорости сканирования 100 мВ/с и α 0,5 было определено как $2,2 \pm 0,2 \text{ с}^{-1}$.

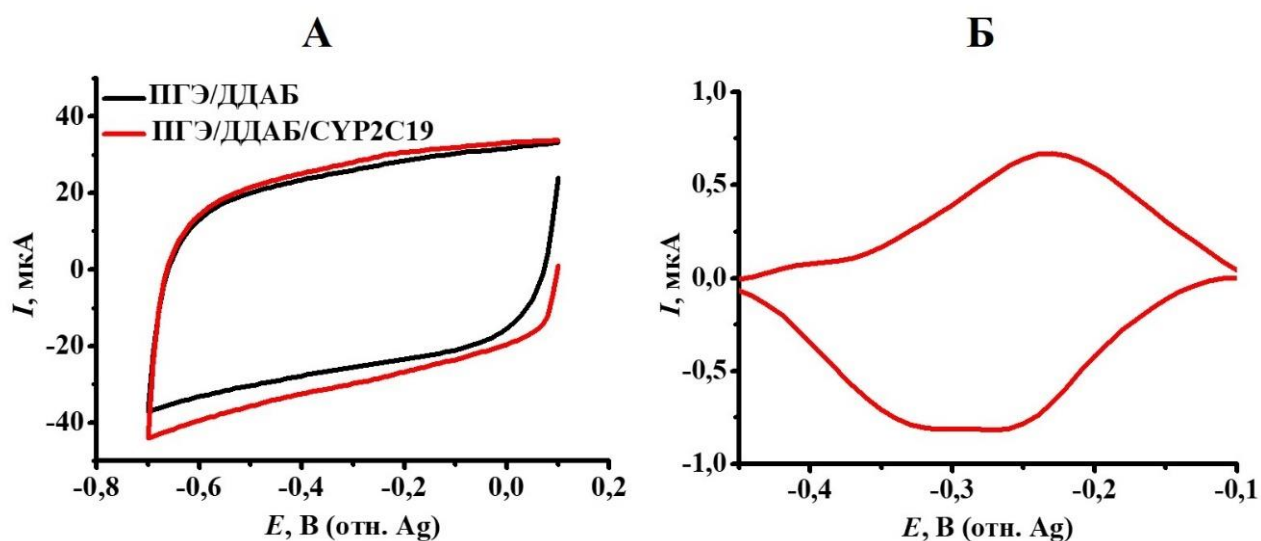


Рисунок 52. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ (—), и с иммобилизованным СУР2С19 (—) в насыщенном аргоном 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl (А). Циклическая вольтамперограмма, полученная после вычитания циклической вольтамперограммы ПГЭ, модифицированного ДДАБ, без фермента из циклической вольтамперограммы ПГЭ, модифицированного ДДАБ, с иммобилизованным ферментом (Б). Скорость сканирования 100 мВ/с.

В соответствии с уравнением 10, из циклических вольтамперограмм было определено количество электроактивного СУР2С19, иммобилизованного на электроде и потенциально способного участвовать в каталитической реакции по отношению к субстрату, которое составило $7,9 \pm 0,6$ пмоль. С помощью количественного электрохимического определения 4-гидроксифенитоина мы оценили способность иммобилизованного на электроде СУР2С19 катализировать реакцию гидроксилирования фенитоина. Электрокаталитическая реакция проводилась в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 150 мкМ фенитоин, при фиксированном потенциале

рабочего электрода, равном -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 53). Таким образом, мы показали, что основной вклад в образование 4-гидроксифенитоина в электрокаталитической системе вносит CYP2C19, иммобилизованный на электроде. V гидроксирования фенитоина под действием CYP2C19 при данных условиях проведения электрокаталитической реакции была определена как $0,14 \pm 0,03 \text{ мин}^{-1}$. Мы также оценили влияние ингибитора CYP2C19 флуконазола (2-(2,4-дифлюорофенил)-1,3-бис(1,2,4-триазол-1-ил)пропан-2-ол) на активность фермента по отношению к 150 мкМ фенитоину, регистрируемую по амплитуде тока пика в области 0,6 В (отн. Ag) после проведения электрокаталитической реакции (рисунок 53). Флуконазол является противогрибковым препаратом и сильным ингибитором CYP2C19 [291, 292]. При концентрации флуконазола 1 мкМ и вышеуказанных условиях проведения электрокаталитической реакции наблюдалось уменьшение тока пика окисления в области 0,6 В (отн. Ag). V гидроксирования фенитоина (150 мкМ) под действием CYP2C19 в присутствии 1 мкМ флуконазола была определена как $0,05 \pm 0,01 \text{ мин}^{-1}$. Таким образом, в присутствии 1 мкМ флуконазола активность фермента снижалась в 2,8 раз, по сравнению с активностью в отсутствие флуконазола.

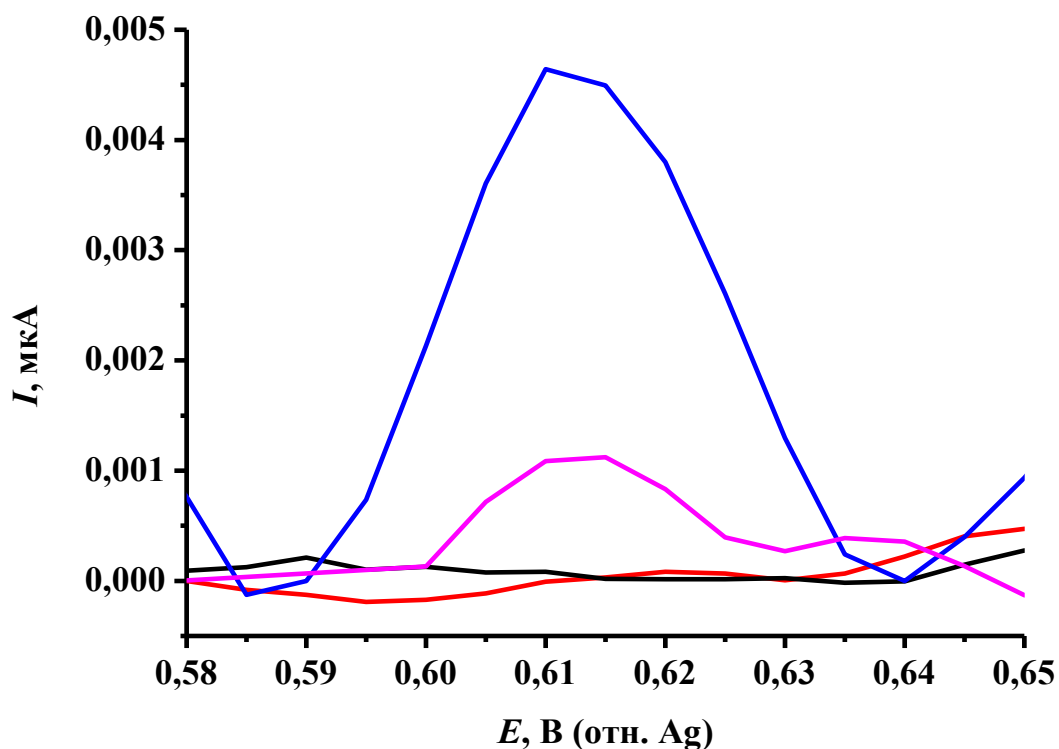


Рисунок 53. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 150 мкМ фенитоин, до (—) или после проведения электрокаталитической реакции в течение 90 мин при фиксированном потенциале -0,6 В (отн. Ag) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ (—) и с иммобилизованным CYP2C19, в отсутствие (—) или в присутствии 1 мкМ флуконазола (—). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ.

Мы исследовали зависимость начальной скорости реакции CYP2C19-зависимого гидроксилирования фенитоина от его концентрации в электрохимической системе (рисунок 54 А).

Зависимость, представленная на рисунке 54 А, могла быть аппроксимирована гиперболической функцией, описываемой уравнением Михаэлиса-Ментен ($R^2 = 0,9774$), однако более удовлетворительно ($R^2 = 0,9987$) данная зависимость описывалась уравнением 17 для кинетики двух ферментов, метаболизирующих

один субстрат, или для двух сайтов связывания субстрата (бифазный кинетический профиль). Уравнение 17 включает в себя два компонента, характеризующие способность фермента образовывать с субстратом комплексы с высокой и низкой аффинностью. Для подтверждения отклонения от модели Михаэлиса-Ментен кинетического профиля биотрансформации фенитоина под действием CYP2C19 в электрохимической системе мы провели линейаризацию 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 гидроксилирования фенитоина в электрохимической системе при участии CYP2C19 (рисунок 54 Б). Ранее аналогичный характер зависимости скорости образования 4-гидроксифенитоина от концентрации фенитоина наблюдался в микросомах, содержащих CYP2C19, экспрессированный путем кДНК-трансфекции [288].

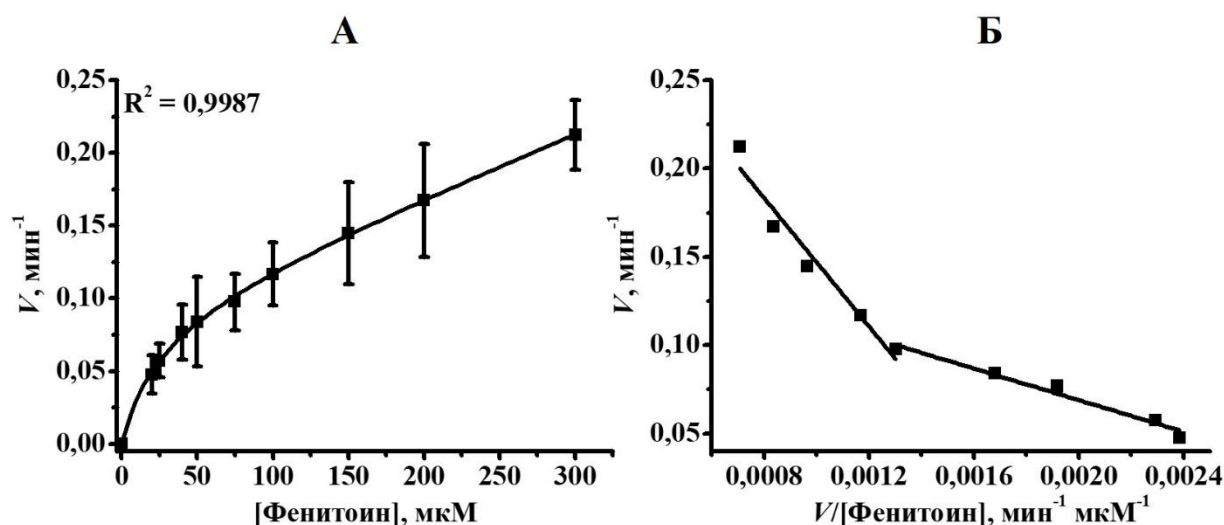


Рисунок 54. Зависимость начальной скорости CYP2C19-зависимого образования 4-гидроксифенитоина от концентрации фенитоина в электрохимической системе (А) и зависимость V от $V/[\text{Фенитоин}]$ (координаты Иди-Хофсти) (Б). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

Первый компонент уравнения 17 был аппроксимирован моделью Михаэлиса-Ментен и описывался уравнением вида: $V, \text{мин}^{-1} = ((0,09405 \pm 0,00191), \text{мин}^{-1} \times [\text{Фенитоин}], \text{мкМ}) / ((25,76139 \pm 2,01094), \text{мкМ} + [\text{Фенитоин}], \text{мкМ})$. Таким образом, значения V_{max1} и K_{M1} CYP2C19 по отношению к фенитоину в электрохимической системе были определены нами как $0,094 \pm 0,002 \text{ мин}^{-1}$ и $25,8 \pm 2,0 \text{ мкМ}$, соответственно. Отношение $V_{\text{max1}}/K_{\text{M1}}$, характеризующее эффективность катализа или внутренний клиренс для формы фермента, образующей с субстратом комплекс с высокой аффинностью, было определено как $0,0036 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$. Второй компонент уравнения 17 может быть аппроксимирован линейной зависимостью, наклон которой характеризует внутренний клиренс формы фермента, образующей с субстратом комплекс с высокой аффинностью, ($V_{\text{max2}}/K_{\text{M2}}$). Значение $V_{\text{max2}}/K_{\text{M2}}$ для CYP2C19 по отношению к фенитоину в электрохимической системе было определено как $0,00042 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$.

Несмотря на то, что в иммобилизованном состоянии ферменты могут существенно изменять свои свойства и кинетические параметры, мы обнаружили, что CYP2C19, иммобилизованный на электроде, имеет схожие свойства, проявляемые им в альтернативной ферментативной системе, что было исследовано ранее Giancarlo и соавт. [288]. Это отражается в атипичном характере кинетического профиля гидроксилирования фенитоина и количественных параметрах, характеризующих ферментативный процесс (таблица 4).

Таблица 4. Сравнение кинетических параметров CYP2C19 по отношению к фенитоину, полученных с помощью микросомальной и электрохимической систем.

Ферментативная система	$V_{\text{max1}}, \text{мин}^{-1}$	$K_{\text{M1}}, \text{мкМ}$	$V_{\text{max1}}/K_{\text{M1}}^{**}, \text{мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$	$V_{\text{max2}}/K_{\text{M2}}^{***}, \text{мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$	Ссылка
Микросомальная*	0,085	24,1	0,0035	0,00029	[288]
Электрохимическая	$0,094 \pm 0,002$	$25,8 \pm 2,0$	0,0036	0,00042	Данная работа

Продолжение таблицы 4

Примечание: *Микросомы, содержащие CYP2C19 человека, экспрессированный путем кДНК-трансфекции.

**Значение для формы фермента, образующей с субстратом комплекс с высокой аффинностью.

***Значение получено как тангенс угла наклона линейной зависимости для формы фермента, образующей с субстратом комплекс с низкой аффинностью.

Суммируя полученные данные, на примере гидроксилирования фенитоина при участии CYP2C19 и разработанного нами метода количественного электрохимического определения 4-гидроксифенитоина мы показали, что иммобилизованные на электроде рекомбинантные формы цитохрома P450 могут иметь атипичный профиль биотрансформации и кинетические параметры, аналогичные полученным для фермента, находящегося в растворе. Однако это все же не может исключать вероятность, что при иммобилизации на электроде других изоферментов цитохромов P450, демонстрирующих атипичные кинетические свойства в других ферментативных системах, их кинетические профили, не говоря уже о кинетических параметрах, могут существенно изменяться.

3.1.6. Биэлектродная электрохимическая система для определения каталитической активности CYP2E1 по отношению к хлорзоксазону

Как отмечалось выше, наряду с созданием электрохимических систем на основе рекомбинантных цитохромов P450, интенсивное развитие получили электрохимические системы на основе адсорбированных (иммобилизованных) на электродах мембраносвязанных цитохромов P450. Преимуществом таких систем является отсутствие необходимости выделения цитохрома P450 из мембранного микроокружения, что позволяет избежать инактивации фермента. В отличие от рекомбинантных форм ферментов, которые при адсорбции на немодифицированных электродах могут терять стабильность и активность,

иммобилизация мембраносвязанных цитохромов Р450 может препятствовать потере каталитической активности [140, 141].

CYP2E1 наряду с алкогольдегидрогеназой участвует в окислении этанола [293-296]. Метаболизм ряда лекарственных препаратов, осуществляемый при участии этого фермента, приводит к образованию токсичных соединений [297, 298]. CYP2E1 рассматривается как фармакологическая мишень для снижения токсичности, вызванной метаболизмом алкоголя, а также взаимодействиями между лекарствами и алкоголем, что вызывает интерес поиска селективных ингибиторов этого фермента [299]. Одним из субстратов CYP2E1 является хлорзоксазон – миорелаксант центрального действия, метаболизм которого при участии этого фермента происходит с образованием 6-гидроксихлорзоксазона [300] (рисунок 55), при этом хлорзоксазон является маркерным субстратом CYP2E1 и широко используется для определения активности этого фермента [301].

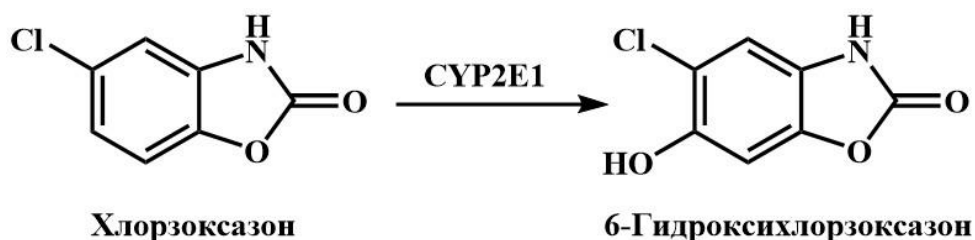


Рисунок 55. Реакция 6-гидроксилирования хлорзоксазона при участии CYP2E1.

В данной части работы мы предприняли попытку создать удобную в практическом применении электрохимическую систему для определения активности мембраносвязанного CYP2E1. Для этого использовалась биэлектродная стратегия, в которой один из электродов использовался для иммобилизации бактосом, содержащих CYP2E1 человека, CPR и *cyt b₅* человека, а другой электрод – для количественного определения 6-гидроксихлорзоксазона путем его электрохимического окисления на электроде. В данной системе электрод, использующийся для иммобилизации бактосом, выступает источником электронов для восстановления CYP2E1 и инициирования каталитической

реакции, при этом CYP2E1 находится в мембранном окружении и в присутствии своих природных редокс партнерных белков (CPR и cyt b_5), что позволяет достичь максимальной стабильности фермента. Наличие в системе cyt b_5 позволяет получить ферментативную систему с максимальной активностью, поскольку известно, что данный гемопротеин активирует каталитическую функцию CYP2E1 [32, 302, 303]. Количественное вольтамперометрическое определение образующегося метаболита реакции (6-гидроксихлорзоксазона) за счет его прямого электрохимического окисления при потенциалах, отличных от потенциала окисления субстрата (хлорзоксазона), могло бы позволить избежать дополнительных стадий выделения метаболита при исследовании каталитической активности CYP2E1.

Мы исследовали электрохимические свойства хлорзоксазона и 6-гидроксихлорзоксазона и их эквимольной смеси методом циклической вольтамперометрии в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl (рисунок 56).

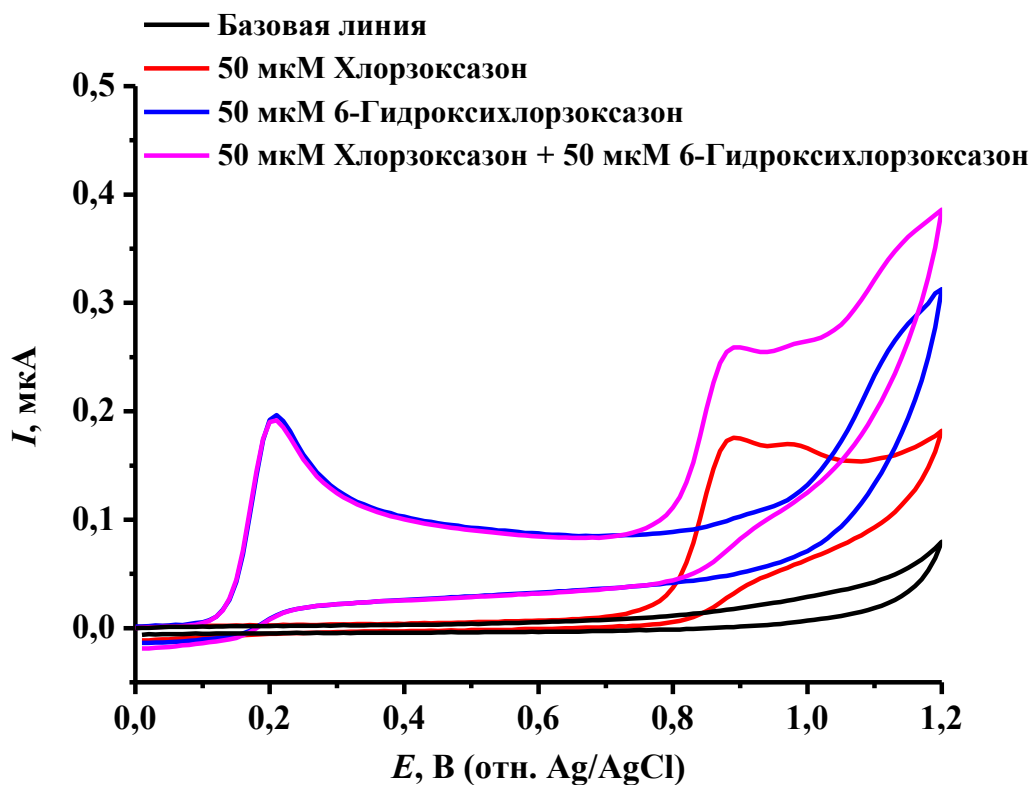


Рисунок 56. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl (—) и 50 мкМ хлорзоксазон (—), 50 мкМ 6-гидроксихлорзоксазон (—) или смесь 50 мкМ хлорзоксазона и 50 мкМ 6-гидроксихлорзоксазона (—). Скорость сканирования 100 мВ/с.

Как видно на рисунке 56, хлорзоксазон при концентрации 50 мкМ имеет пик окисления в области 0,892 В (отн. Ag/AgCl) и пик в области 0,972 В (отн. Ag/AgCl). Ранее в работе Abbar и соавт. были исследованы электрохимические свойства хлорзоксазона с помощью СУЭ [304]. Авторы зарегистрировали пик окисления хлорзоксазона в 200 мМ фосфатном буфере (рН 7,0) при 0,9072 В (отн. Ag/AgCl), а также показали, что процесс электрохимического окисления хлорзоксазона происходит с участием количества электронов, эквивалентного количеству протонов. На основании экспериментальных данных, авторы предположили механизм электрохимического окисления хлорзоксазона, сопровождаемый отщеплением одного протона и одного электрона с последующим присоединением воды, декарбоксилированием и формированием конечного продукта 2-амино-4-

хлорфенола. Позже полученные Vaniahmad и соавт. данные по исследованию электрохимического окисления хлорзоксазона подтвердили предположенный ранее механизм электрохимического окисления этого соединения [305]. Для 6-гидроксихлорзоксазона при концентрации 50 мкМ мы зарегистрировали пик окисления в области 0,207 В (отн. Ag/AgCl), пик с небольшой амплитудой в области 0,891 В (отн. Ag/AgCl) и пик в области 1,114 В (отн. Ag/AgCl). Мы предположили, что пик окисления в области 0,207 В (отн. Ag/AgCl) может отражать процесс окисления гидроксифенильной группы 6-гидроксихлорзоксазона, при этом пики в области 0,891 В (отн. Ag/AgCl) и 1,114 В (отн. Ag/AgCl), по-видимому, отражают процесс окисления молекулы по механизму, схожему с механизмом окисления хлорзоксазона.

Чтобы предположить механизм электрохимического окисления 6-гидроксихлорзоксазона, мы зарегистрировали циклические вольтамперограммы при различных значениях pH 100 мМ калий-фосфатного фонового электролита, содержащего 50 мМ NaCl (рисунок 57 А).

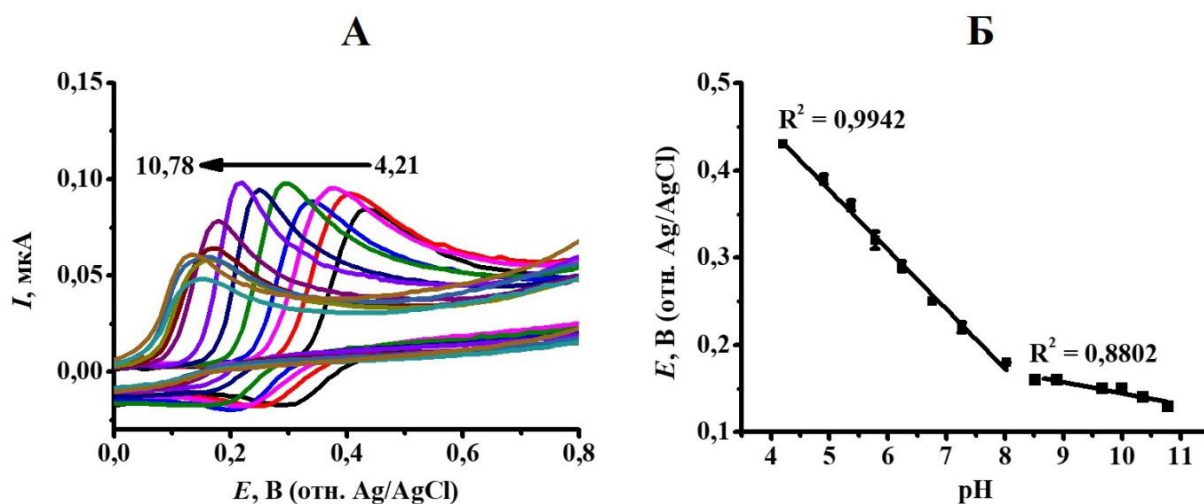


Рисунок 57. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном фоновом электролите, содержащем 50 мМ NaCl и 50 мкМ 6-гидроксихлорзоксазон, при различных значениях pH (4,21-10,78) (А) и зависимость потенциала пика окисления 6-гидроксихлорзоксазона от pH (Б). Скорость сканирования 100 мВ/с. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

Как видно на рисунке 57 А, при увеличении рН пик окисления 6-гидроксихлорзоксазона смещается в область с меньшим значением потенциалов. При этом в диапазоне потенциалов от 0,1 до 0,3 В (отн. Ag/AgCl) регистрируется пик восстановления, значение тока которого примерно в 5,5 раз меньше, по сравнению со значением тока окислительного пика. При рН больше 8,02 восстановительный ток практически исчезает. Зависимость потенциала окисления 6-гидроксихлорзоксазона от рН в диапазоне 4,21-8,02 имела линейный характер ($R^2 = 0,9942$) и описывалась уравнением: $E, В = -(0,06833 \pm 0,00197), В/рН \times рН + (0,71957 \pm 0,01217), В$ (рисунок 57 Б). Таким образом, полученное значение наклона прямой 0,068 В/рН близко к теоретически рассчитанному значению 0,059 В/рН, которое свидетельствует об участии в электрохимическом процессе одинакового количества электронов и протонов [77]. В диапазоне рН 8,52-10,78 потенциал пика окисления 6-гидроксихлорзоксазона изменялся незначительно, и полученная зависимость была аппроксимирована прямой ($R^2 = 0,8802$), описываемой уравнением: $E, В = -(0,01285 \pm 0,00209), В/рН \times рН + (0,27299 \pm 0,02036), В$ (рисунок 57 Б). Излом прямого участка зависимости потенциала окисления 6-гидроксихлорзоксазона от рН указывает на достижение значений рН (8,02-8,89), близких к значению pK_a гидроксифенильной группы молекулы 6-гидроксихлорзоксазона. Это хорошо согласуется со значением pK_a , равным 8,55 для молекулы 2-хлорфенола [306], фрагмент которой имеется в структуре 6-гидроксихлорзоксазона. Кроме того, значение рН 8,3 соответствует значению pK_a хлорзоксазона [307], и, по-видимому, близко к значению рН иминогруппы в молекуле 6-гидроксихлорзоксазона. Таким образом, при достижении рН 8,02-8,89 количество протонов, участвующих в окислении 6-гидроксихлорзоксазона уменьшается, на что указывает слабое изменение потенциала окисления 6-гидроксихлорзоксазона. Количество электронов, участвующих в окислении 6-гидроксихлорзоксазона, может быть рассчитано по уравнению 23 [77]:

$$E_p - E_{p/2} = \frac{1,857RT}{\alpha nF}, \quad (23)$$

где E_p – потенциал пика, В, $E_{p/2}$ – потенциал полупика, В.

Приняв значение α равным 0,5, мы определили среднее значение n в диапазоне рН 4,21-10,78 как 1,9, при этом среднее количество протонов, участвующих в реакции окисления 6-гидроксихлорзоксазона в диапазоне рН 4,21-8,02, с учетом полученного наклона зависимости потенциала пика от рН, было определено как 2,3. Таким образом, мы предположили, что механизм окисления 6-гидроксихлорзоксазона связан с отщеплением двух электронов и двух протонов и образованием конечного продукта 5-хлорбензоксазол-2,6-диона (рисунок 58).

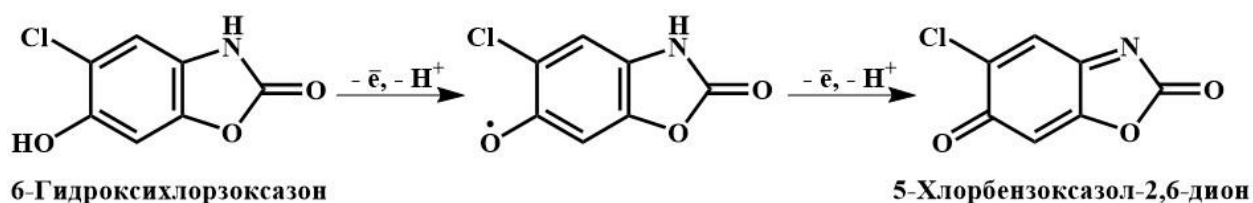


Рисунок 58. Предполагаемый механизм электрохимического окисления 6-гидроксихлорзоксазона.

В эквимольной смеси хлорзоксазона и 6-гидроксихлорзоксазона были зарегистрированы пики окисления в области 0,207 В (отн. Ag/AgCl), 0,896 В (отн. Ag/AgCl), 0,980 В (отн. Ag/AgCl) и 1,120 В (отн. Ag/AgCl). Пик в области 0,207 В (отн. Ag/AgCl) имеет значения потенциала и тока, аналогичные соответствующим характеристикам пика окисления гидроксифенильной группы 6-гидроксихлорзоксазона в отсутствие хлорзоксазона. Пики в области 0,896 В (отн. Ag/AgCl), 0,980 В (отн. Ag/AgCl) и 1,120 В (отн. Ag/AgCl) отражают процессы окисления 6-гидроксихлорзоксазона и хлорзоксазона. Таким образом, мы показали возможность определения 6-гидроксихлорзоксазона по пику его электрохимического окисления в области 0,207 В (отн. Ag/AgCl) в смеси, содержащей хлорзоксазон.

Для количественного определения 6-гидроксихлорзоксазона нами использовался метод квадратно-волновой вольтамперометрии. Пик окисления гидроксифенильной группы 6-гидроксихлорзоксазона был зарегистрирован в области $0,203 \pm 0,022$ В (отн. Ag/AgCl) (рисунок 59 А).

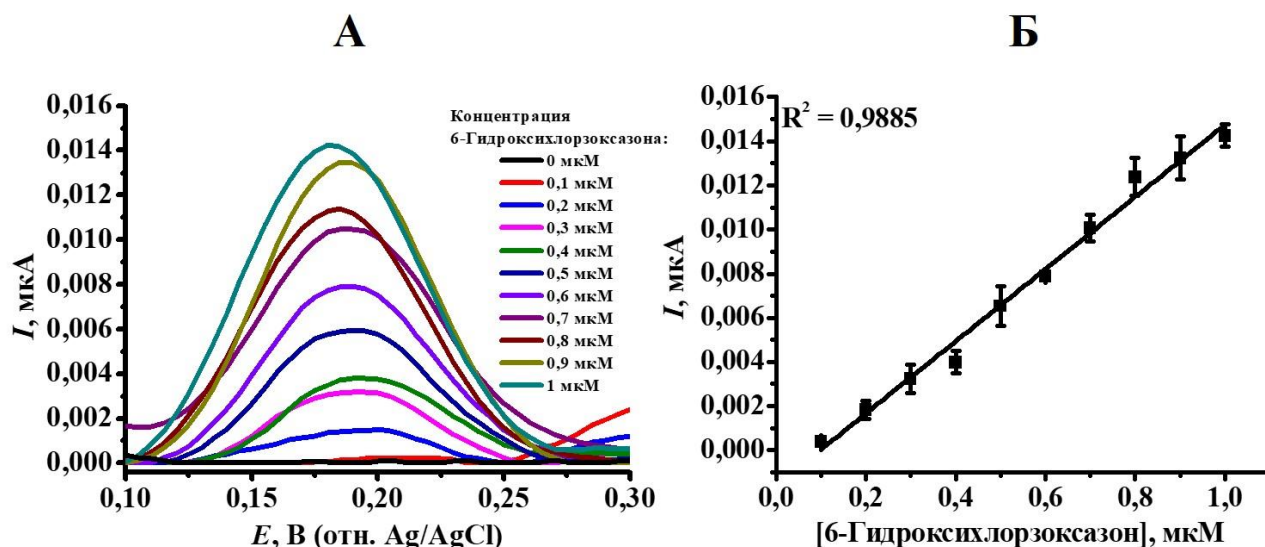


Рисунок 59. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и различные концентрации (от 0 до 1 мкМ) 6-гидрохлорзоксазона (А). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ. Зависимость тока пика окисления от концентрации 6-гидрохлорзоксазона (Б). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

Зависимость тока пика окисления от концентрации 6-гидрохлорзоксазона (в диапазоне 0,1-1 мкМ) в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, имела линейный характер ($R^2 = 0,9885$) и описывалась уравнением прямой: $I, \text{мкА} = (0,01635 \pm 0,00059), \text{мкА/мкМ} \times [\text{6-Гидрохлорзоксазон}], \text{мкМ} - (0,00161 \pm 0,00036), \text{мкА}$ (рисунок 59 Б). Чувствительность была определена как 0,016 мкА/мкМ. Предел определяемых концентраций, рассчитанный с учетом трехкратного стандартного отклонения среднего значения тока в области потенциала окисления 6-гидрохлорзоксазона, был определен как 110 нМ.

Таким образом, разработана методика идентификации и количественного определения 6-гидрохлорзоксазона за счет его прямого электрохимического окисления на немодифицированных ПГЭ, которая применялась нами в дальнейшем

для оценки каталитической активности СУР2Е1-содержащих бактосом по отношению к хлорзоксиазону.

Для иммобилизации бактосом на электроде в качестве модификатора электродной поверхности мы использовали ДДАБ. Мы предполагаем, что взаимодействие бактосом с электродом, модифицированным ДДАБ, происходит за счет гидрофобных взаимодействий компонентов бактосом и алифатических цепей ДДАБ, а также за счет электростатических взаимодействий отрицательно заряженных фосфатных групп фосфолипидов мембран бактосом и положительно заряженного атома азота молекулы ДДАБ.

Мы зарегистрировали циклическую вольтамперограмму электрода с иммобилизованными бактосомами в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, насыщенном аргонном (рисунок 60 А). После вычитания фоновой кривой циклическая вольтамперограмма электрода с иммобилизованными бактосомами характеризовалась пиком восстановления при $E_c -0,345 \pm 0,006$ В (отн. Ag/AgCl) и пиком окисления при $E_a -0,251 \pm 0,013$ В (отн. Ag/AgCl) (рисунок 60 Б). Значение E_m было определено как $-0,298 \pm 0,010$ В (отн. Ag/AgCl). Поскольку исследуемые бактосомы содержат в своем составе гемопротеины СУР2Е1 и cyt b_5 , мы предположили, что полученная редокс пара пиков соответствует одновременно процессам восстановления и окисления как иона железа гема СУР2Е1, так и иона железа гема cyt b_5 .

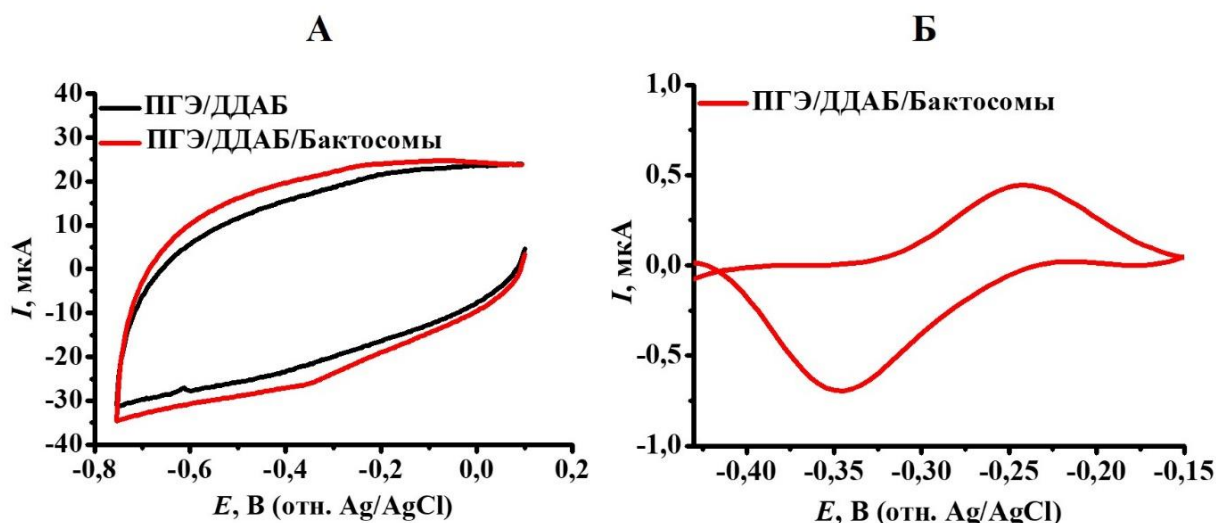


Рисунок 60. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ (—), и с иммобилизованными бактосомами (—) в насыщенном аргоне 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl (А). Циклическая вольтамперограмма, полученная после вычитания циклической вольтамперограммы ПГЭ, модифицированного ДДАБ, без бактосом из циклической вольтамперограммы ПГЭ, модифицированного ДДАБ, с иммобилизованными бактосомами (Б). Скорость сканирования 50 мВ/с.

В соответствии с уравнением 10 и молярным отношением CYP2E1 и $\text{cyt } b_5$ в бактосомах, заявленным производителем, количества электроактивных CYP2E1 и $\text{cyt } b_5$ были рассчитаны как 9 ± 1 пмоль и 45 ± 5 пмоль, соответственно.

Поскольку нам не удалось зафиксировать редокс процесс для флавиновых кофакторов CPR, входящей в состав бактосом, по-видимому, из-за относительно невысокой чувствительности циклической вольтамперометрии, для идентификации пиков восстановления и окисления флавинов CPR бактосом мы использовали метод дифференциально-импульсной вольтамперометрии (рисунок 61).

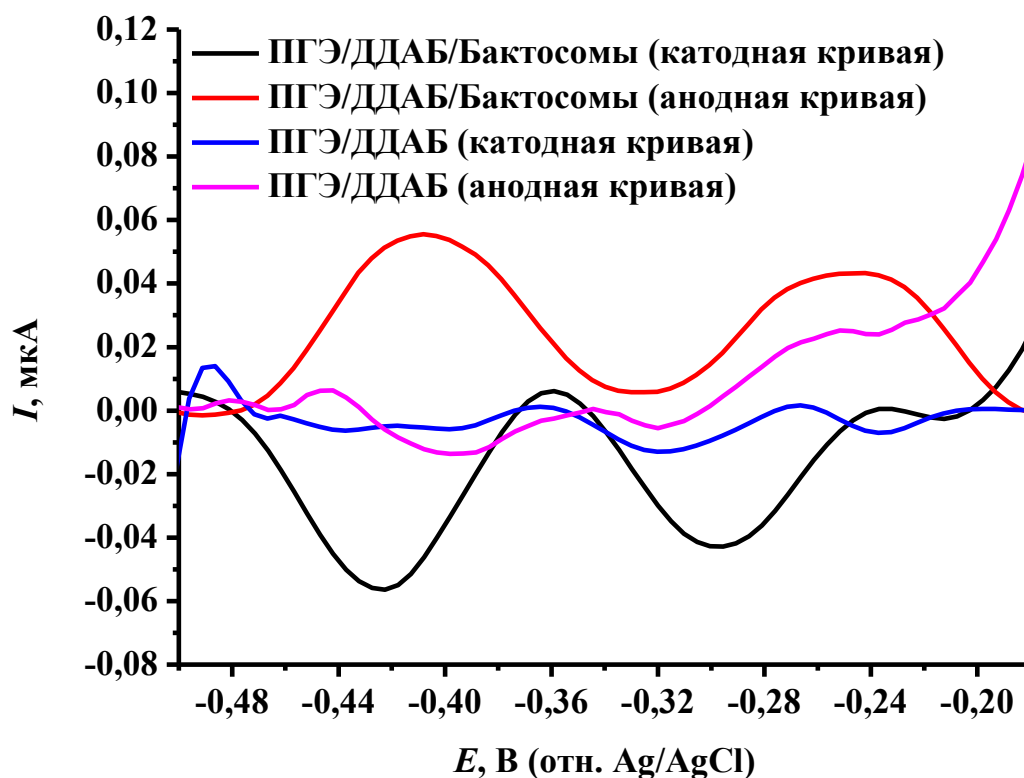


Рисунок 61. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ (катодная кривая (—) и анодная кривая (—)), и с иммобилизованными бактосомами (катодная кривая (—) и анодная кривая (—)) в насыщенном аргоне 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl. Амплитуда модуляции 20 мВ, шаг потенциала 5 мВ, интервал 500 мс, время модуляции 50 мс.

Как видно на рисунке 61, дифференциально-импульсные вольтамперограммы характеризуются пиком восстановления при $E_c -0,307 \pm 0,012$ В (отн. Ag/AgCl) и пиком окисления при $E_a -0,261 \pm 0,020$ В (отн. Ag/AgCl), а рассчитанное значение E_m , $-0,284 \pm 0,011$ В (отн. Ag/AgCl), близко к аналогичному параметру, полученному с помощью метода циклической вольтамперометрии. Таким образом, данная пара пиков характеризует редокс процесс для иона железа гемовых групп CYP2E1 и cyt b_5 . Также на дифференциально-импульсной вольтамперограмме наблюдается пара пиков при $E_c -0,454 \pm 0,038$ В (отн. Ag/AgCl) и при $E_a -0,410 \pm 0,023$ В (отн. Ag/AgCl) со значением $E_m -0,432 \pm 0,026$ В (отн.

Ag/AgCl). Ранее в работах Nerimetla и соавт. для бактосом, содержащих только CPR, электростатически адсорбированных на цистеаминовом монослое кварцевых кристаллов с золотым напылением или электростатически иммобилизованных на электродах из плоского пиролитического графита с функционализированными амином магнитными наночастицами, E^0 при pH 7,0 был определен как $-0,450 \pm 0,038$ В (отн. Ag/AgCl) [148] или $-0,47 \pm 0,02$ В (отн. Ag/AgCl) [95], соответственно. Таким образом, полученное нами значение E_m для второй пары пиков бактосом хорошо согласуется с аналогичным параметром, полученным ранее другими авторами для CPR.

Мы также исследовали электрохимические свойства рекомбинантных CYP2E1 (рисунок 62) и *cyt b₅* (рисунок 63) и их смеси (в молярном отношении 1:5) (рисунок 64), иммобилизованных на электродах, модифицированных ДДАБ.

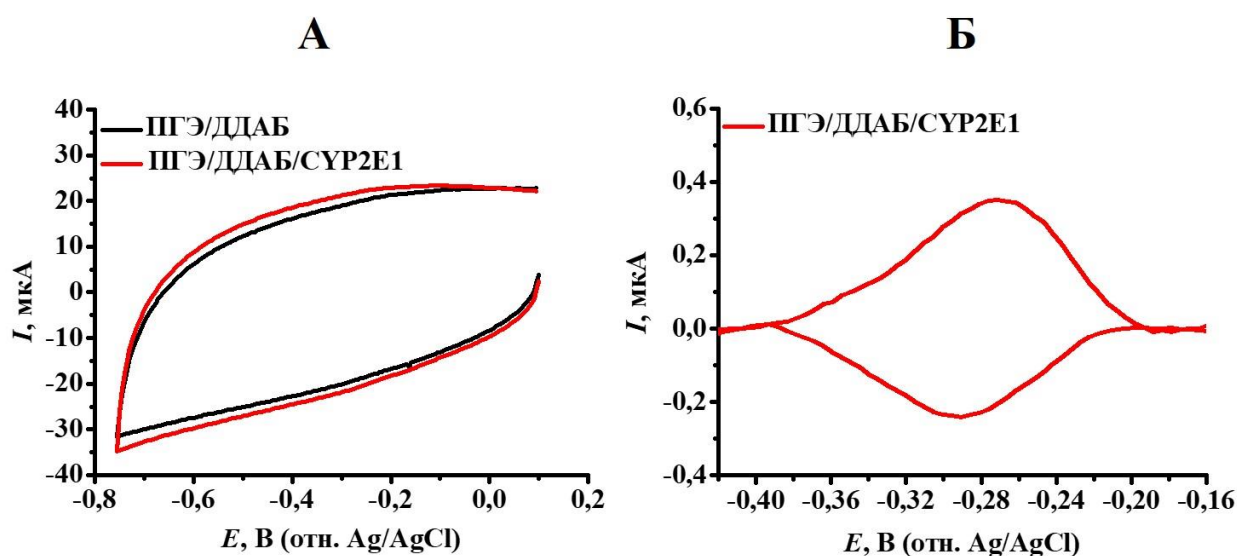


Рисунок 62. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ (—), и с иммобилизованным CYP2E1 (—) в насыщенном аргоном 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl (А). Циклическая вольтамперограмма, полученная после вычитания циклической вольтамперограммы ПГЭ, модифицированного ДДАБ, без CYP2E1 из циклической вольтамперограммы ПГЭ, модифицированного ДДАБ, с иммобилизованным CYP2E1 (Б). Скорость сканирования 50 мВ/с.

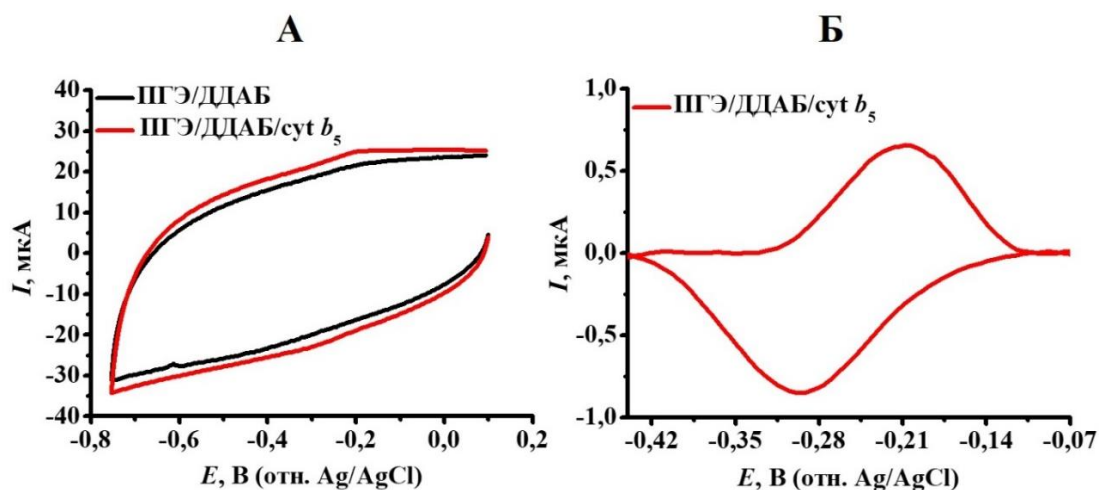


Рисунок 63. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ (—), и с иммобилизованным $\text{cyt } b_5$ (—) в насыщенном аргоном 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl (А). Циклическая вольтамперограмма, полученная после вычитания циклической вольтамперограммы ПГЭ, модифицированного ДДАБ, без $\text{cyt } b_5$ из циклической вольтамперограммы ПГЭ, модифицированного ДДАБ, с иммобилизованным $\text{cyt } b_5$ (Б). Скорость сканирования 50 мВ/с.

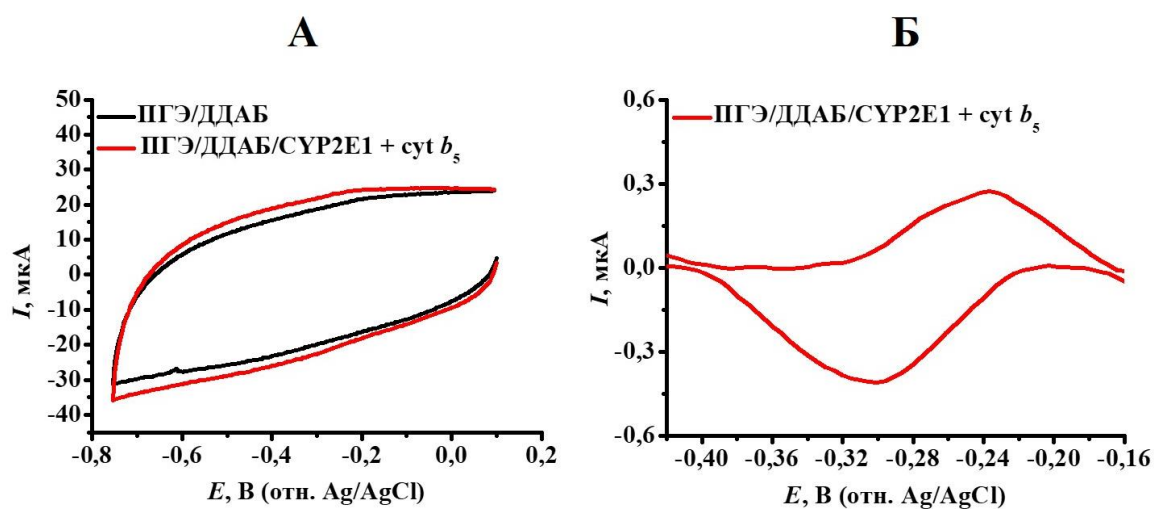


Рисунок 64. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ (—), и с иммобилизованными CYP2E1 и $\text{cyt } b_5$ (—) в насыщенном аргоном 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl (А). Циклическая вольтамперограмма, полученная после вычитания циклической вольтамперограммы ПГЭ, модифицированного ДДАБ, без CYP2E1 и $\text{cyt } b_5$ из циклической вольтамперограммы ПГЭ, модифицированного ДДАБ, с иммобилизованными CYP2E1 и $\text{cyt } b_5$ (Б). Скорость сканирования 50 мВ/с.

После вычитания фоновых кривых для СYP2E1 значения E_c и E_a были зарегистрированы при $-0,301 \pm 0,007$ В (отн. Ag/AgCl) и $-0,263 \pm 0,008$ В (отн. Ag/AgCl), соответственно, а значение E_m рассчитано как $-0,282 \pm 0,005$ В (отн. Ag/AgCl). Таким образом, E_m для СYP2E1 на 16 мВ больше, по сравнению с E_m для бактосом. Для cyt b_5 значения E_c и E_a были зарегистрированы при $-0,288 \pm 0,009$ В (отн. Ag/AgCl) и $-0,222 \pm 0,017$ В (отн. Ag/AgCl), соответственно, и E_m определено как $-0,255 \pm 0,005$ В (отн. Ag/AgCl), что на 43 мВ больше, по сравнению с E_m для бактосом, и на 27 мВ больше, по сравнению с E_m для СYP2E1. Редокс пара также наблюдается для смеси рекомбинантных СYP2E1 и cyt b_5 при потенциалах $-0,310 \pm 0,014$ В (отн. Ag/AgCl) и $-0,242 \pm 0,007$ В (отн. Ag/AgCl), а значение E_m рассчитано как $-0,276 \pm 0,011$ В (отн. Ag/AgCl). Таким образом, E_m для смеси СYP2E1 и cyt b_5 находится между значениями аналогичного параметра для рекомбинантных СYP2E1 и cyt b_5 . Также мы исследовали рекомбинантную CPR крысы, иммобилизованную на электроде, методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии (рисунок 65).

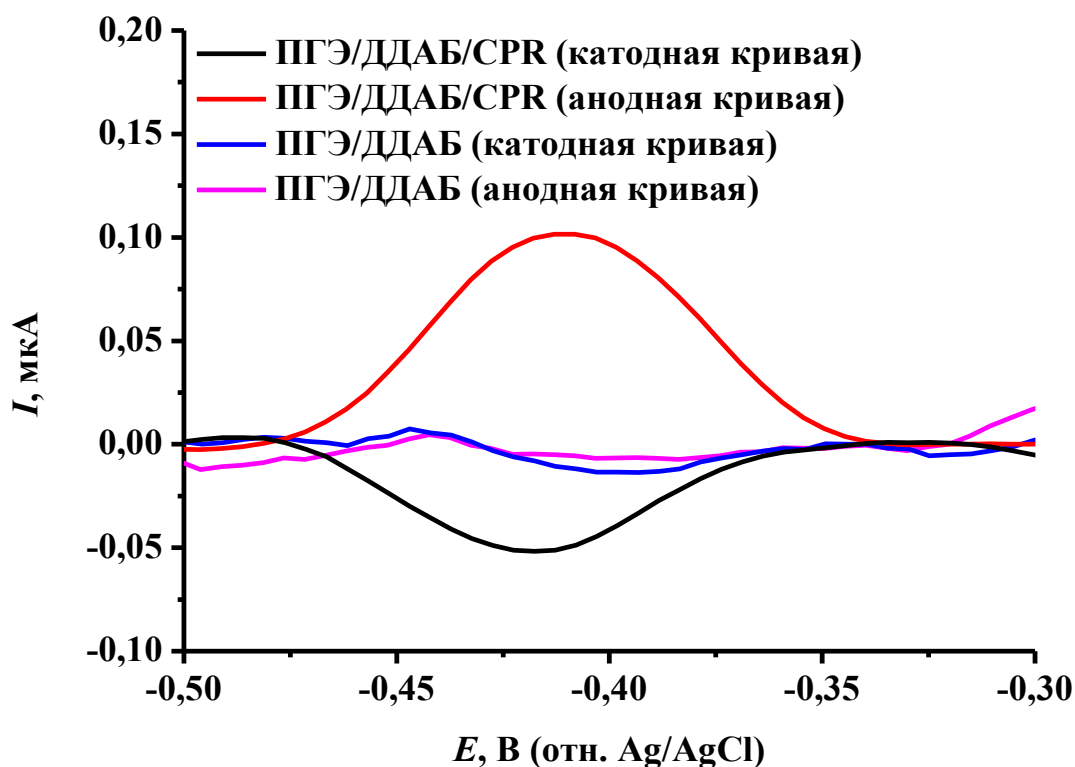


Рисунок 65. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ (катодная кривая (—) и анодная кривая (—)), и с иммобилизованной CPR (катодная кривая (—) и анодная кривая (—)) в насыщенном аргоном 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl. Амплитуда модуляции 20 мВ, шаг потенциала 5 мВ, интервал 500 мс, время модуляции 50 мс.

Как видно на рисунке 65, на катодной ветви наблюдается пик восстановления при $E_c -0,421 \pm 0,003$ В (отн. Ag/AgCl), при этом на анодной ветви наблюдается пик окисления при $E_a -0,402 \pm 0,012$ В (отн. Ag/AgCl), значение E_m было определено как $-0,412 \pm 0,005$ В (отн. Ag/AgCl), что близко к аналогичным параметрам, полученным нами с помощью дифференциально-импульсной вольтамперометрии для второй пары пиков, отражающих редокс процесс для флавиновых кофакторов CPR бактосом.

Анализ полученных данных наводит на мысль, что более отрицательное значение E_m для пары пиков, полученных методом циклической

вольтамперометрии для бактосом, по сравнению с аналогичным параметром для рекомбинантных CYP2E1, cyt b_5 и их смеси, может являться следствием влияния на перенос электронов CPR, входящей в состав бактосом. Вероятно, что акцептором электронов от электрода является как CPR, так и CYP2E1 и cyt b_5 .

Электрохимические характеристики бактосом, CYP2E1, cyt b_5 , смеси CYP2E1 + cyt b_5 и CPR, зарегистрированные в анаэробных условиях, представлены в таблице 5.

Таблица 5. Электрохимические характеристики бактосом, cyt b_5 , смеси CYP2E1 + cyt b_5 и CPR, зарегистрированные в анаэробных условиях.

Иммобилизованный компонент	E_c , В (отн. Ag/AgCl)	E_a , В (отн. Ag/AgCl)	E_m , В (отн. Ag/AgCl)
Бактосомы	$-0,345 \pm 0,006$	$-0,251 \pm 0,013$	$-0,298 \pm 0,010$
	$-0,307 \pm 0,012^*$	$-0,261 \pm 0,020^*$	$-0,284 \pm 0,011^*$
	$-0,454 \pm 0,038^*$	$-0,410 \pm 0,023^*$	$-0,432 \pm 0,026^*$
CYP2E1	$-0,301 \pm 0,007$	$-0,263 \pm 0,008$	$-0,282 \pm 0,005$
cyt b_5	$-0,288 \pm 0,009$	$-0,222 \pm 0,017$	$-0,255 \pm 0,005$
CYP2E1 + cyt b_5	$-0,310 \pm 0,014$	$-0,242 \pm 0,007$	$-0,276 \pm 0,011$
CPR	$-0,421 \pm 0,003^*$	$-0,402 \pm 0,012^*$	$-0,412 \pm 0,005^*$

Примечание: Значения потенциалов, отмеченные знаком «*», зарегистрированы дифференциально-импульсной вольтамперометрией, остальные значения потенциалов зарегистрированы циклической вольтамперометрией.

Стоит отметить, что в пионерских работах по исследованию электрохимических свойств мембраносвязанных компонентов монооксигеназной системы авторы регистрировали редокс активность только CPR. Так, например, Sultana и соавт. наблюдали пару пиков со значением E_m $-0,49$ В (отн. НКЭ) для CYP1A2- и CYP3A4-содержащих микросом, адсорбированных на электродах, модифицированных последовательным нанесением полимерных пленок на основе

полиэтиленimina и полистиролсульфоната, что, как полагают авторы, характеризует редокс процесс для CPR [150]. При этом для рекомбинантных CYP1A2 и CYP3A4 значения E_m были определены как -0,31 В (отн. НКЭ) и -0,32 В (отн. НКЭ), соответственно. На основании этих результатов авторами было сделано предположение, что в микросомах CPR является первичным акцептором электронов от электрода. Кроме того, авторы наблюдали конверсию стирола до оксида стирола при проведении электрокаталитической реакции при потенциале, при котором происходит восстановление CPR. Nerimetla и соавт. также наблюдали пару пиков со значением $E^{0'}$ -450 ± 40 мВ (отн. Ag/AgCl) для бактосом, содержащих CYP2C9 и CPR, электростатически адсорбированных на золотом кварцевом кристалле, модифицированном самоорганизующимися монослоями на основе цистеинамина, при этом значения $E^{0'}$ для рекомбинантных форм CYP2C9 и CPR были определены как -310 ± 20 мВ (отн. Ag/AgCl) и -450 ± 38 мВ (отн. Ag/AgCl), соответственно [148]. Кроме того, Walgama и соавт. при адсорбции микросом человека на различные электроды из углеродных материалов регистрировали пару пиков со значениями $E^{0'}$ в области от -0,450 В (отн. Ag/AgCl) до -0,470 В (отн. Ag/AgCl), что соответствует $E^{0'}$, характерному для CPR [140]. Перенос электронов в системе, содержащей одновременно CPR и CYP1A2 или CYP2E1, последовательно нанесенные на полиионные подложки, от электрохимически восстановленной формы CPR на цитохромы P450, а не напрямую от электрода, также подтверждался Krishnan и соавт. [308].

С другой стороны, в работе Xu и соавт. при иммобилизации микросом, содержащих CYP2C9 и CPR, на СУЭ, модифицированный нанокомпозитным материалом на основе наночастиц оксида титана и хитозана, при pH 7,4 авторы наблюдали пару пиков при E_c -0,404 В (отн. НКЭ) и E_a -0,382 В (отн. НКЭ), при этом авторы заключили, что данная пара отражает редокс процесс, в который вовлечены гем CYP2C9 и флавиновые кофакторы CPR [94].

Мы полагаем, что такая разница в наблюдаемых механизмах переноса электронов в различных системах, одновременно содержащих CPR и цитохромы P450, может объясняться использованием различных типов и модификаций

электродов для иммобилизации ферментов и, следовательно, доступностью активных центров для прямого электрохимического восстановления их кофакторов.

Далее мы проанализировали электрохимические характеристики бактосом, рекомбинантных CYP2E1, cyt b_5 , их смеси (CYP2E1 + cyt b_5) и CPR в аэробных условиях. Циклическая вольтамперограмма электрода с иммобилизованными бактосомами характеризовалась двумя пиками восстановления: $-0,262 \pm 0,007$ В (отн. Ag/AgCl) и $-0,418 \pm 0,017$ В (отн. Ag/AgCl) (рисунок 66).

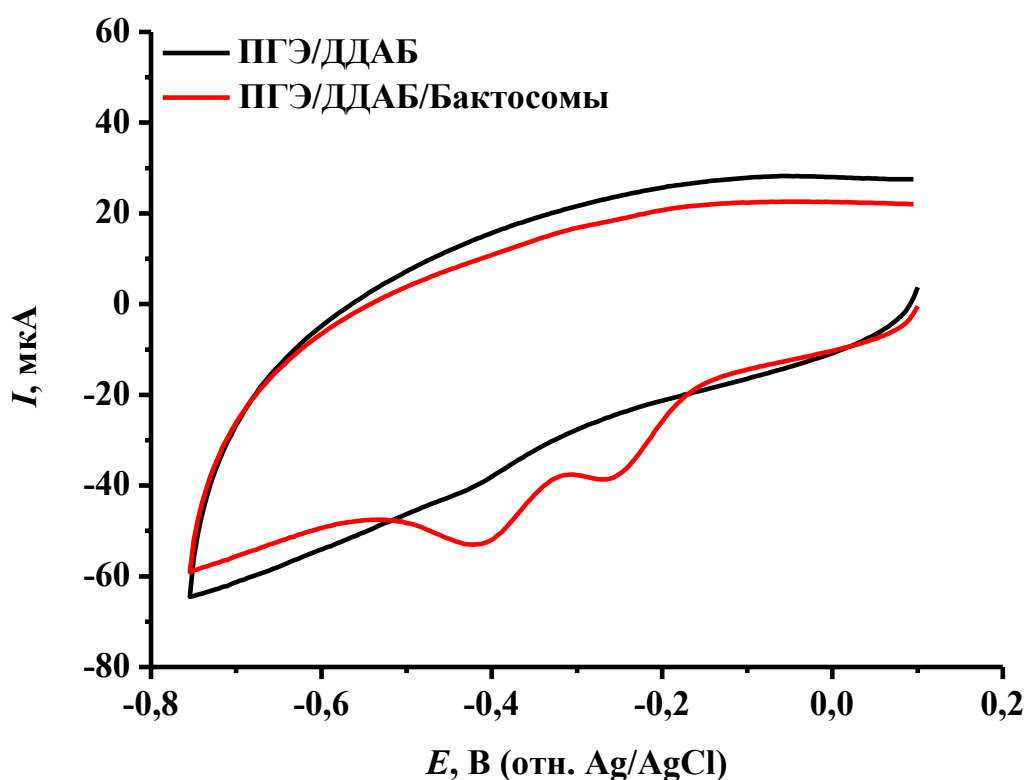


Рисунок 66. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ (—), и с иммобилизованными бактосомами (—) в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl. Скорость сканирования 50 мВ/с.

Ранее Carraga и соавт. обнаруживали расщепление восстановительного пика при исследовании электрохимических свойств CYP1A2-содержащих микросом, при этом после математической обработки авторам удалось получить два пика

восстановления: при $-0,380$ В (отн. Ag/AgCl) и при $-0,560$ В (отн. Ag/AgCl), как полагают авторы, соответствующие процессам восстановления CYP1A2 и CPR [163].

Мы предположили, что зарегистрированные нами в аэробных условиях пики восстановления также соответствуют восстановлению иона железа гема гемопротеинов CYP2E1 и cyt b_5 , входящих в состав бактосом ($-0,262 \pm 0,007$ В (отн. Ag/AgCl)), и флавиновых кофакторов CPR ($-0,418 \pm 0,017$ В (отн. Ag/AgCl)). Для того, чтобы проверить это предположение, мы проанализировали электрохимические свойства рекомбинантных CYP2E1, cyt b_5 и CPR в аэробных условиях. Для CYP2E1 циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная в аэробных условиях, характеризовалась пиком восстановления при $E_c -0,228 \pm 0,005$ В (отн. Ag/AgCl) (рисунок 67).

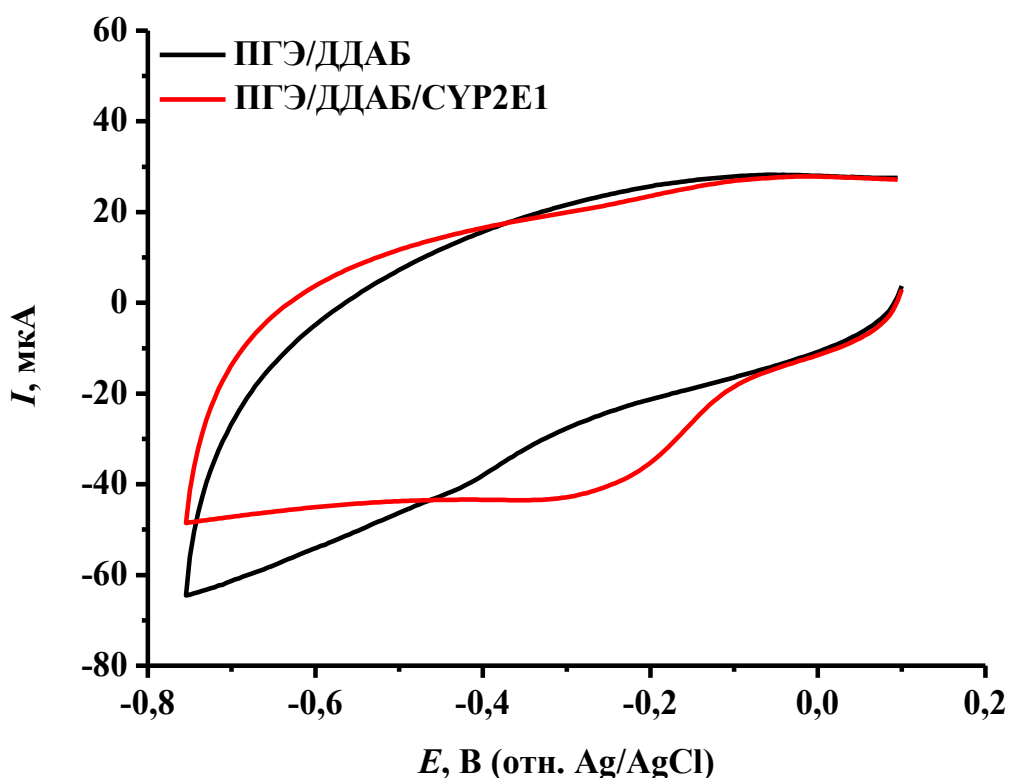


Рисунок 67. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ (—), и с иммобилизованным CYP2E1 (—) в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl. Скорость сканирования 50 мВ/с.

Таким образом, потенциал пика восстановления иона железа гема СУР2Е1 в аэробных условиях на 73 мВ больше, по сравнению с потенциалом пика восстановления, зарегистрированным для СУР2Е1 в анаэробных условиях. Циклическая вольтамперограмма для *cyt b₅* в аэробных условиях характеризовалась пиком восстановления при $E_c -0,200 \pm 0,007$ В (рисунок 68), что имеет на 88 мВ более положительное значение, по сравнению с потенциалом восстановления данного белка в анаэробных условиях.

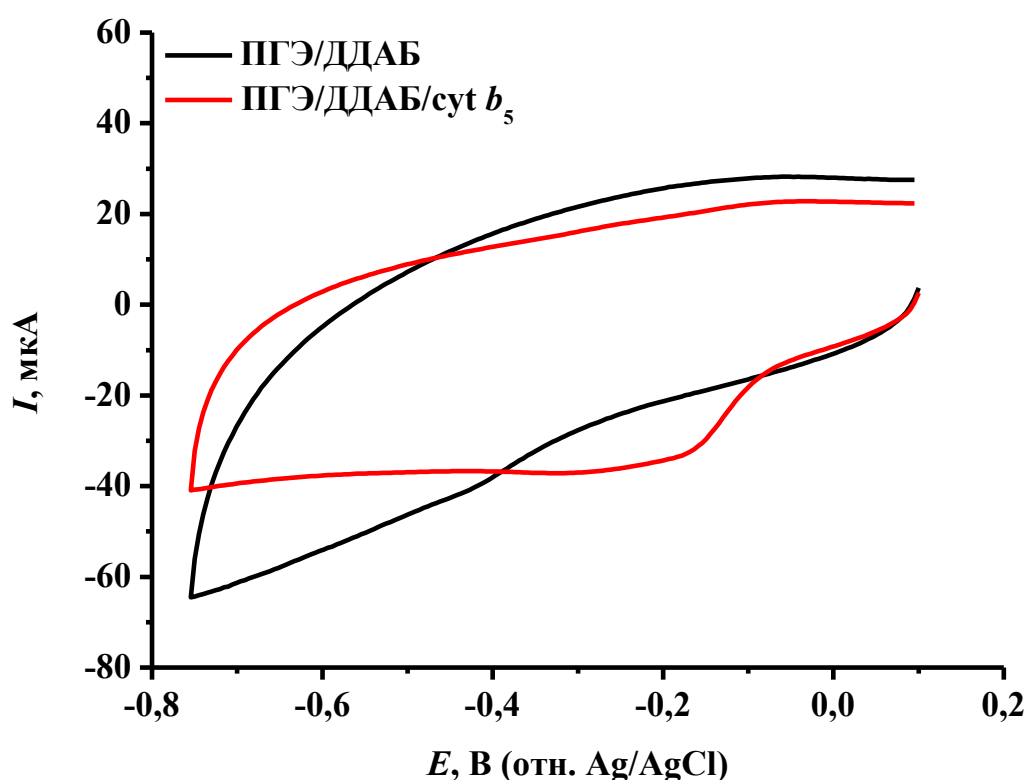


Рисунок 68. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ (—), и с иммобилизованным *cyt b₅* (—) в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl. Скорость сканирования 50 мВ/с.

Для смеси СУР2Е1 + *cyt b₅* значение E_c пика восстановления было определено как $-0,214 \pm 0,023$ (отн. Ag/AgCl) (рисунок 69), что на 96 мВ больше, по

сравнению со значением E_c пика восстановления, зарегистрированного в анаэробных условиях.

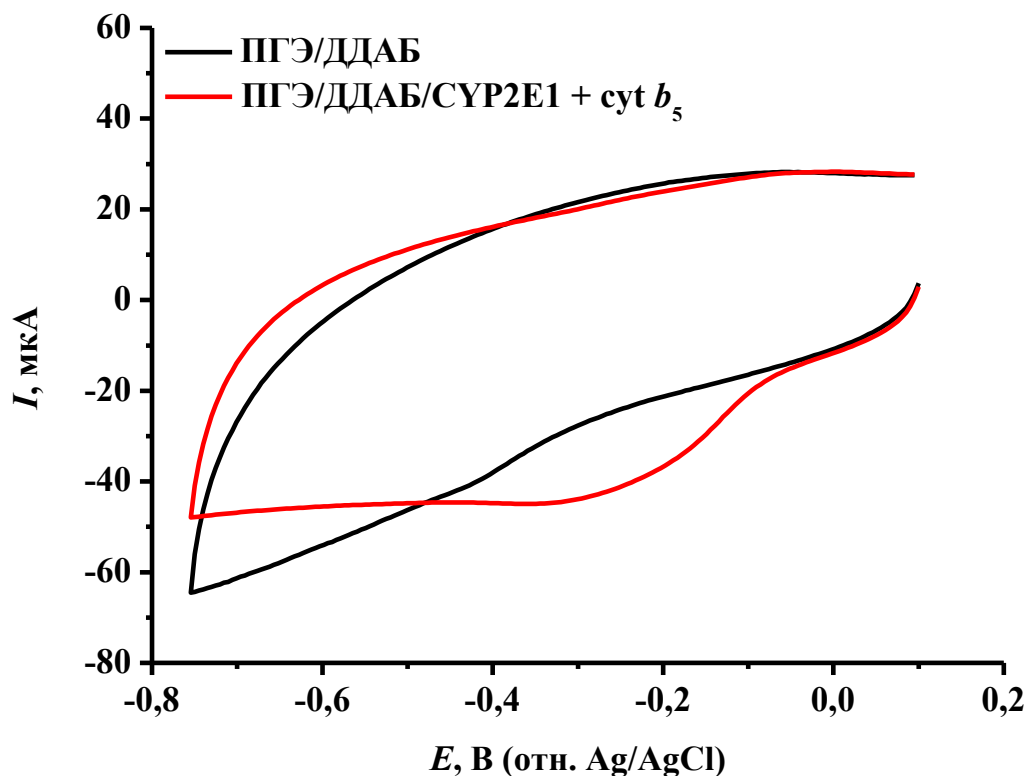


Рисунок 69. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ (—), и с иммобилизованными CYP2E1 и cyt b_5 (—) в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl. Скорость сканирования 50 мВ/с.

Несмотря на то, что для CPR в анаэробных условиях методом циклической вольтамперометрии не удалось зафиксировать редокс процесс, в аэробных условиях на циклической вольтамперограмме был зарегистрирован пик восстановления при $E_c -0,429 \pm 0,024$ В (отн. Ag/AgCl) и пик окисления при $E_a -0,396 \pm 0,006$ В (отн. Ag/AgCl) (рисунок 70), характеризующие, соответственно, процесс восстановления и окисления флавиновых простетических групп CPR. При этом, полученные значения потенциалов близки к соответствующим значениям

потенциалов, зарегистрированных методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии для CPR в анаэробных условиях.

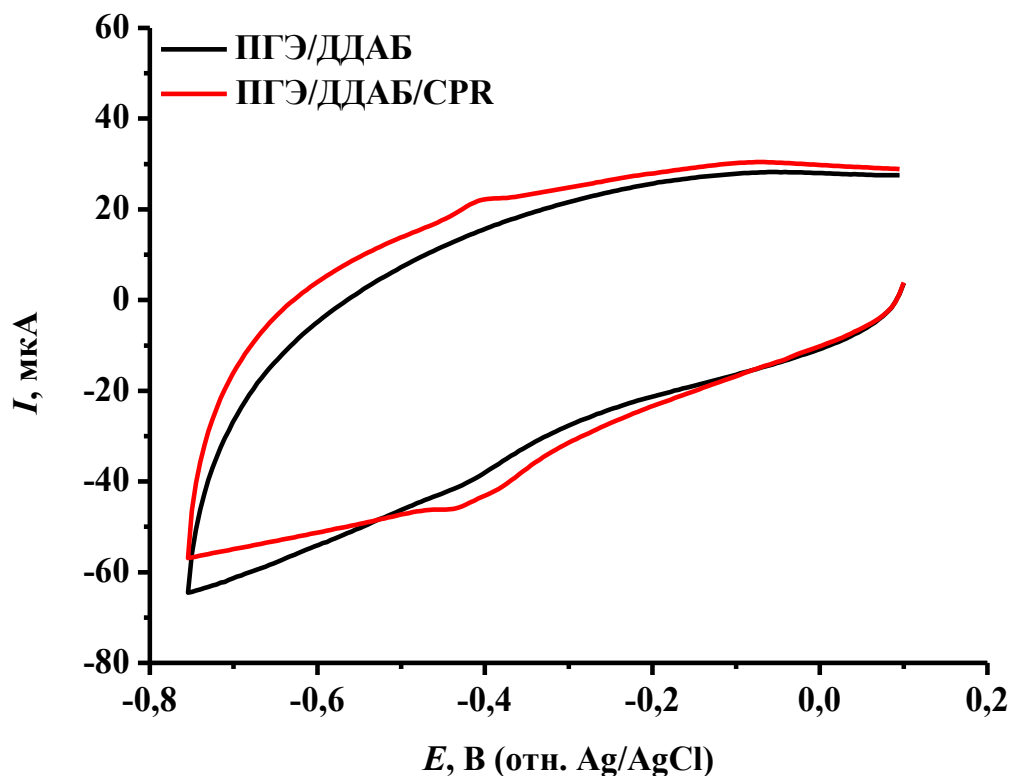


Рисунок 70. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ (—), и с иммобилизованной CPR (—) в 100 mM калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 mM NaCl. Скорость сканирования 50 мВ/с.

Таким образом, анализируя полученные характеристики, можно говорить о том, что восстановительный пик при $E_c -0,262 \pm 0,007$ В (отн. Ag/AgCl), зарегистрированный для бактосом в аэробных условиях, скорее всего, соответствует процессу восстановления иона железа гема как CYP2E1, так и cyt b_5 , при этом пик восстановления при $E_c -0,418 \pm 0,017$ В (отн. Ag/AgCl) соответствует восстановлению флавиновых кофакторов CPR. Кроме того, можно объяснить и наличие двух пиков восстановления для бактосом в аэробных условиях и один пик восстановления в анаэробных. Сдвиг потенциалов восстановления

рекомбинантных CYP2E1 и cyt b_5 в более положительную область в присутствии кислорода объясняет и тот факт, что в аэробных условиях, по сравнению с анаэробными, пики восстановления иона железа гема этих двух гемопротеинов и флавиновых простетических групп CPR становятся разрешимыми. Также стоит обратить внимание на отсутствие пика окисления CPR в составе бактосом в аэробных условиях, в то время как рекомбинантная CPR имеет пик окисления. По-видимому, это связано с тем, что в составе бактосом после электрохимического восстановления флавиновых простетических групп электроны с CPR переносятся на CYP2E1 и/или на cyt b_5 , имеющие более положительные, по сравнению с CPR, значения потенциалов, т.е. реализуется механизм межмолекулярного переноса электронов, аналогичный природным цитохром P450-содержащим системам (донор электронов $\rightarrow$ CPR $\rightarrow$ цитохром P450/cyt b_5).

Мы оценили возможность определения каталитической активности CYP2E1 в бактосомах с помощью разработанной биелектродной системы. Каталитическая активность бактосом, иммобилизованных на электродах, модифицированных ДДАБ, по отношению к хлорзоксазону определялась с помощью определения образующегося 6-гидроксихлорзоксазона методом квадратно-волновой вольтамперометрии. Электрокаталитическая реакция проводилась в течение 60 мин в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и 500 мкМ хлорзоксазон при фиксированном значении потенциала рабочего электрода - 0,550 В (отн. Ag/AgCl), при котором происходит электрохимическое восстановление компонентов бактосом. 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 71, после проведения электрокаталитической реакции с иммобилизованными на электроде бактосомами в области потенциалов, соответствующей электрохимическому окислению 6-гидроксихлорзоксазона, регистрируется пик. При этом после проведения электрокаталитической реакции с электродом без бактосом в области потенциалов, соответствующей электрохимическому окислению 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.

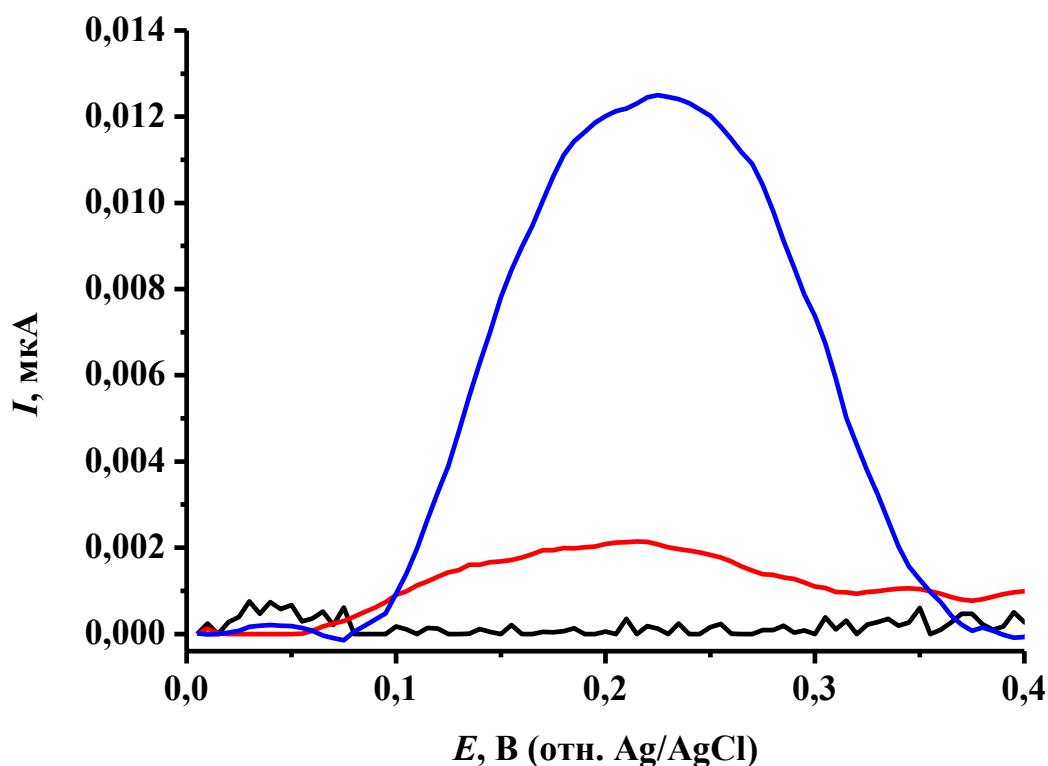


Рисунок 71. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью немодифицированных ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и 500 мкМ хлорзоксазон, до (—) или после проведения электрокаталитической реакции в течение 60 мин при фиксированном потенциале -0,550 В (отн. Ag/AgCl) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ (—) и с иммобилизованными бактосомами, содержащими CYP2E1 (—). Частота 25 Гц, амплитуда 40 мВ, шаг потенциала 5 мВ.

Как видно на рисунке 72, при концентрации хлорзоксазона, равной 500 мкМ, количество 6-гидроксихлорзоксазона, образующегося в процессе электрокаталитической реакции с иммобилизованными на электроде бактосомами,

линейно зависело от времени электрокаталитической реакции в диапазоне 30-90 мин ($R^2 = 0,9938$).

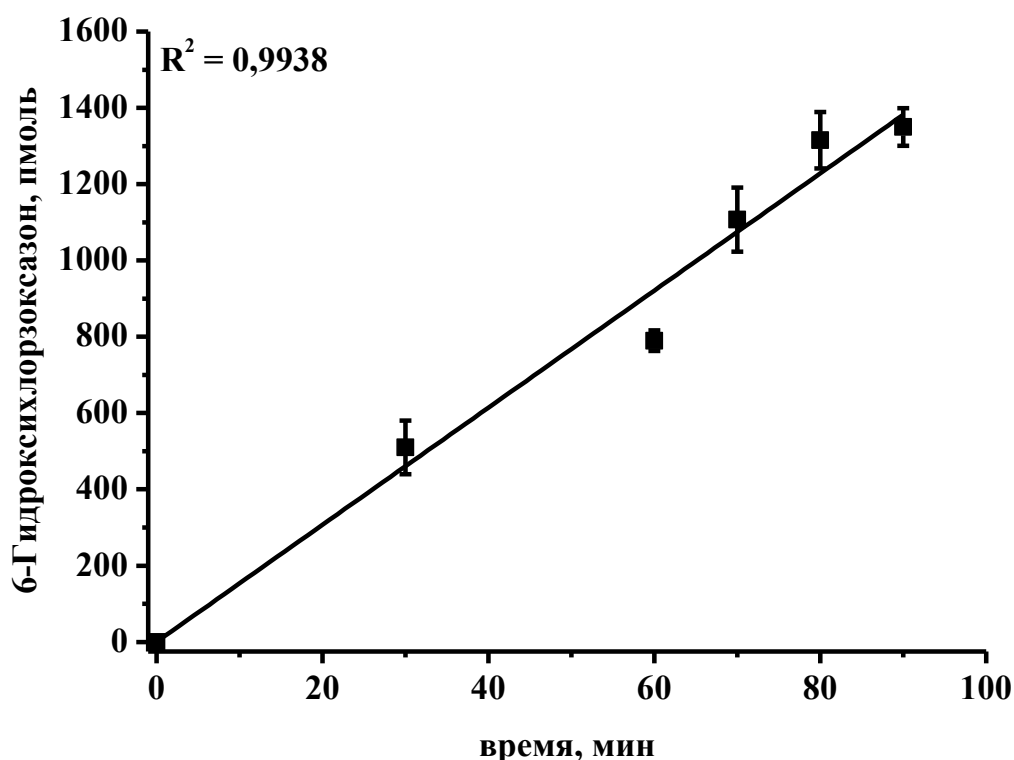


Рисунок 72. Зависимость количества образующегося 6-гидроксихлорзоксазона от времени проведения электрокаталитической реакции с ПГЭ, модифицированными ДДАБ и с иммобилизованными бактосомами. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

V гидроксилирования хлорзоксазона (500 мкМ) под действием CYP2E1 в бактосомах, иммобилизованных на электроде, была определена как $1,47 \pm 0,05 \text{ мин}^{-1}$.

Мы сравнили полученную с помощью электрохимического определения 6-гидроксихлорзоксазона V гидроксилирования хлорзоксазона под действием бактосом на электроде с таковой, полученной при определении 6-гидроксихлорзоксазона с помощью тонкослойной хроматографии с последующим количественным спектрофотометрическим анализом (рисунок 73).

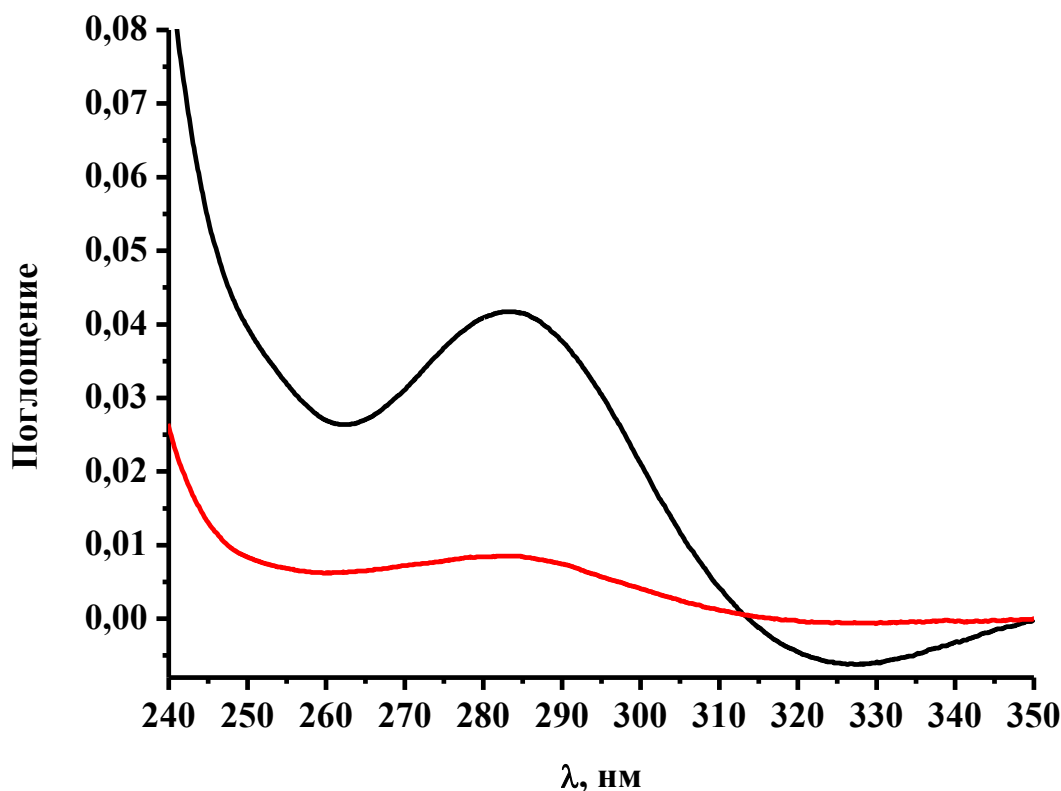


Рисунок 73. Спектры поглощения 6-гидросихлорзоксазона, полученные после тонкослойной хроматографии и элюции в 600 мкл этанола пятна, соответствующего 2,5 нмоль 6-гидросихлорзоксазона (контроль, —), и элюции в таком же объеме этанола пятна, соответствующего 6-гидросихлорзоксазону, идентифицированного после тонкослойной хроматографии инкубационной смеси, полученной после проведения электрокаталитической реакции в 100 мМ калий-фосфатного буфере (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl и 500 мкМ хлорзоксазон, в течение 90 мин при фиксированном потенциале -0,550 В (отн. Ag/AgCl) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ и с иммобилизованными бактосомами (—). Спектры поглощения были зарегистрированы после прописывания базовой линии с этанолом.

На рисунке 73 видно, что в области 285 нм регистрируются пики поглощения 6-гидросихлорзоксазона, полученного при элюции пятна, соответствующего 2,5 нмоль 6-гидросихлорзоксазона, нанесенного на пластину в качестве контроля, и

пятна, соответствующего 6-гидроксихлорзоксазону, полученного путем хроматографического разделения инкубационной смеси после проведения электрокаталитической реакции в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и 500 мкМ хлорзоксазон, в течение 90 мин при фиксированном потенциале -0,550 В (отн. Ag/AgCl) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ с иммобилизованными бактосомами. Из калибровочной зависимости оптической плотности в максимуме поглощения 6-гидроксихлорзоксазона от концентрации этого соединения в стандартных растворах было определено количество образующегося в процессе электрокаталитической реакции 6-гидроксихлорзоксазона, которое соответствовало V гидроксилирования хлорзоксазона под действием бактосом, иммобилизованных на электроде, равной $1,50 \pm 0,61 \text{ мин}^{-1}$. Таким образом, значения V гидроксилирования хлорзоксазона, полученные с помощью двух различных методов количественного определения образующегося 6-гидроксихлорзоксазона в процессе электрокаталитической реакции, хорошо сопоставимы между собой.

Для определения параметров стационарной кинетики CYP2E1 в составе бактосом, иммобилизованных на электроде, по отношению к хлорзоксазону, мы исследовали начальную скорость образования 6-гидроксихлорзоксазона от концентрации хлорзоксазона в электрохимической системе. При этом образующийся 6-гидроксихлорзоксазон определялся методом квадратно-волновой вольтамперометрии. Полученная зависимость начальной скорости образования 6-гидроксихлорзоксазона от концентрации хлорзоксазона (рисунок 74) имела гиперболический характер ($R^2 = 0,9819$) и описывалась уравнением: $V, \text{ мин}^{-1} = ((1,64331 \pm 0,07501), \text{ мин}^{-1} \times [\text{Хлорзоксазон}], \text{ мкМ}) / ((77,72608 \pm 9,21225), \text{ мкМ} + [\text{Хлорзоксазон}], \text{ мкМ})$.

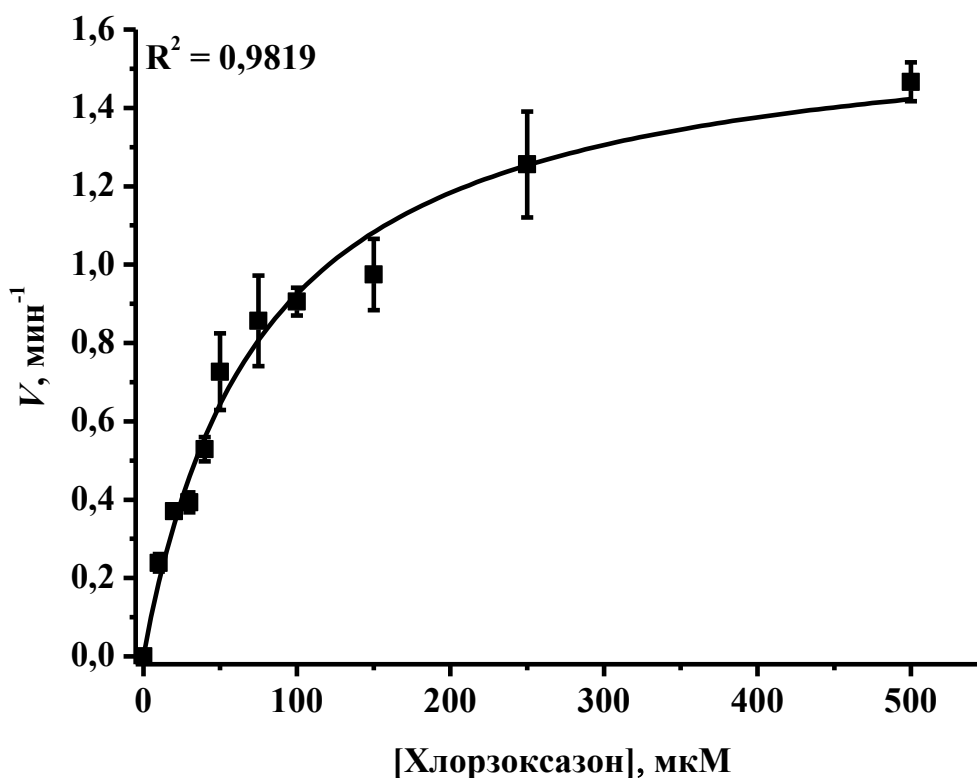


Рисунок 74. Зависимость начальной скорости СYP2E1-зависимого образования 6-гидросихлорзоксазона от концентрации хлорзоксазона в электрохимической системе. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

Значения $V_{\max}$ и K_M были определены как $1,64 \pm 0,08 \text{ мин}^{-1}$ и $78 \pm 9 \text{ мкМ}$. Значение $V_{\max}/K_M$ было рассчитано как $0,021 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$. Полученное значение $V_{\max}$ примерно в 5,7 раз меньше аналогичного параметра, заявленного производителем бактосом, при этом полученное с помощью электрохимической системы значение K_M хорошо согласуется с аналогичным параметром, заявленным производителем (75 мкМ). Таким образом, каталитическая эффективность бактосом по отношению к хлорзоксазону в электрохимической системе примерно в 6 раз меньше, по сравнению с аналогичной характеристикой, заявленной производителем и полученной с помощью альтернативной системы. По-видимому, это является следствием изменений ориентации и/или конформации фермента, возникающих при иммобилизации бактосом на электроде, например, приводящих

к менее эффективному восстановлению электронами от электрода, по сравнению с восстановлением в реконструированной системе электронами от NADPH. В таблице 6 приводится сравнение кинетических параметров 6-гидроксилирования хлорзоксазона в NADPH-зависимой и электрохимической системах.

Таблица 6. Параметры стационарной кинетики 6-гидроксилирования хлорзоксазона при участии бактосом в NADPH-зависимой и электрохимической системах.

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

Примечание: *Представлены параметры, заявленные производителем бактосом.

Ранее Peter и соавт. исследовали хлорзоксазон 6-гидроксилазную активность микросом человека от различных доноров и получили среднее значение K_M 39 ± 7 мкМ [300]. Eagling и соавт. и Lucas и соавт. получили значения K_M для 6-гидроксилирования хлорзоксазона при участии микросом человека $59,2 \pm 5,7$ мкМ [309] и 53-74 мкМ [310], соответственно. Сравнительно большее значение K_M (232 мкМ) было получено Оно и соавт. при исследовании хлорзоксазон 6-гидроксилазной активности микросом человека, трансфицированных рекомбинантным вирусом коровьей оспы, содержащим кДНК CYP2E1 [311].

Для установления механизма переноса электронов от электрода к CYP2E1 нами была поставлена задача исследовать влияние CPR на V гидроксилирования хлорзоксазона под действием бактосом в электрохимической системе. Мы предположили, что в случае переноса электронов от электрода на CPR и далее с CPR на CYP2E1/cyt b_5 начальная скорость гидроксилирования хлорзоксазона будет больше, чем начальная скорость гидроксилирования хлорзоксазона при восстановлении только CYP2E1/cyt b_5 . Для этого мы провели электрокаталитические реакции с иммобилизованными на электроде бактосомами

в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl, 280 Ед/мл каталазы и 150 мкМ хлорзоксиазон при потенциалах восстановления -0,550 В (отн. Ag/AgCl) и -0,350 В (отн. Ag/AgCl).

Потенциал восстановления -0,550 В (отн. Ag/AgCl) имеет более отрицательное значение, по сравнению со значениями потенциалов пиков восстановления на циклической вольтамперограмме, зарегистрированной для бактосом в аэробных условиях. Поэтому мы предположили, что при проведении электрокаталитической реакции при данном фиксированном потенциале поток электронов от электрода будет восстанавливать как CPR, так и CYP2E1/cyt b_5 . При потенциале -0,350 В (отн. Ag/AgCl), который находится положительнее пика восстановления CPR, но отрицательнее пика восстановления CYP2E1/cyt b_5 , электроны с электрода должны переноситься преимущественно на CYP2E1/cyt b_5 . Для наглядности на рисунке 75 проиллюстрированы потенциалы восстановления компонентов бактосом, рекомбинантных CYP2E1, cyt b_5 и CPR, а также значения приложенных потенциалов к рабочим электродам с иммобилизованными бактосомами, при которых проводились CPR/CYP2E1/cyt b_5 -опосредованная и CYP2E1/cyt b_5 -опосредованная электрокаталитические реакции по отношению к хлорзоксиазону.

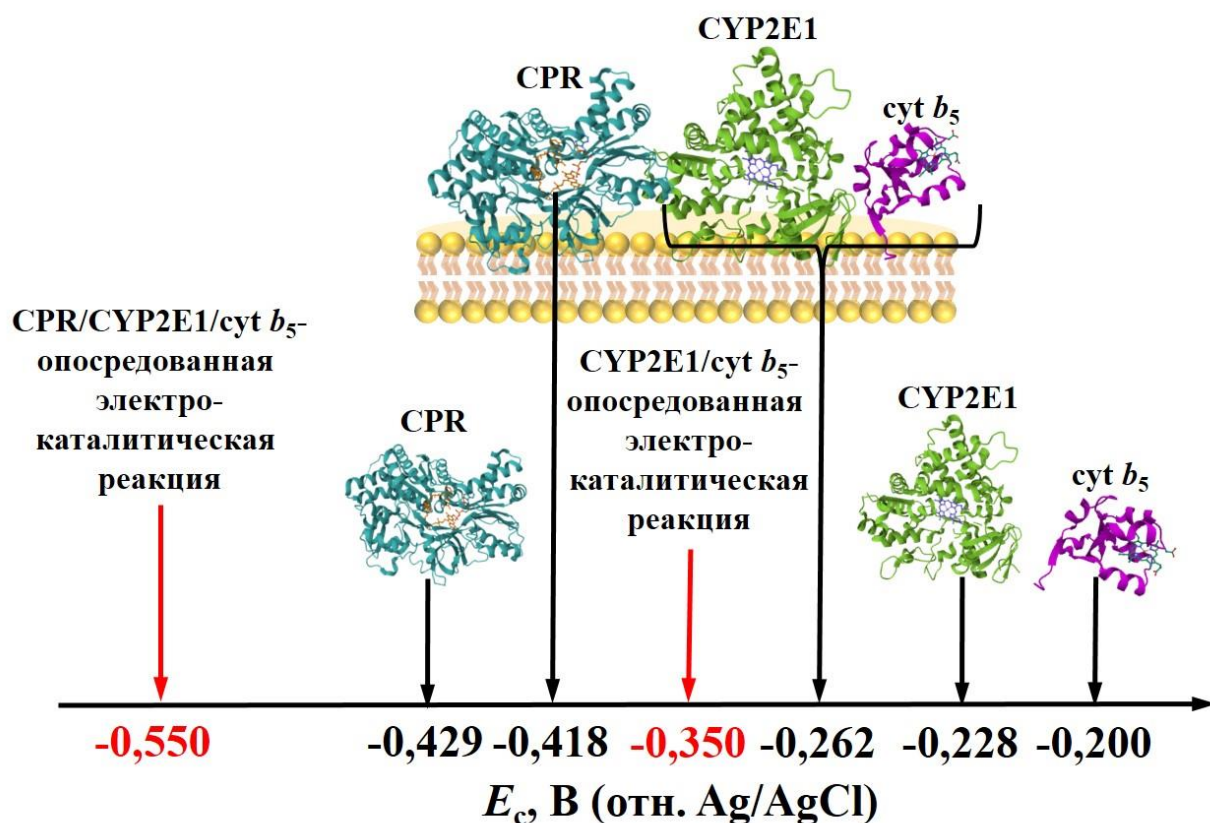


Рисунок 75. Потенциалы восстановления компонентов бактосом, рекомбинантных CYP2E1, cyt b_5 и CPR (показаны черным цветом), а также значения приложенных потенциалов к рабочим электродам с иммобилизованными бактосомами, при которых проводились CPR/CYP2E1/cyt b_5 -опосредованная и CYP2E1/cyt b_5 -опосредованная электрокаталитические реакции по отношению к хлорзоксазону (показаны красным цветом).

Как и ожидалось, начальная скорость образования 6-гидросихлорзоксазона 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-гидросихлорзоксазона при проведении электрокаталитической реакции при потенциале -0,350 В (отн. Ag/AgCl) (рисунок 76).

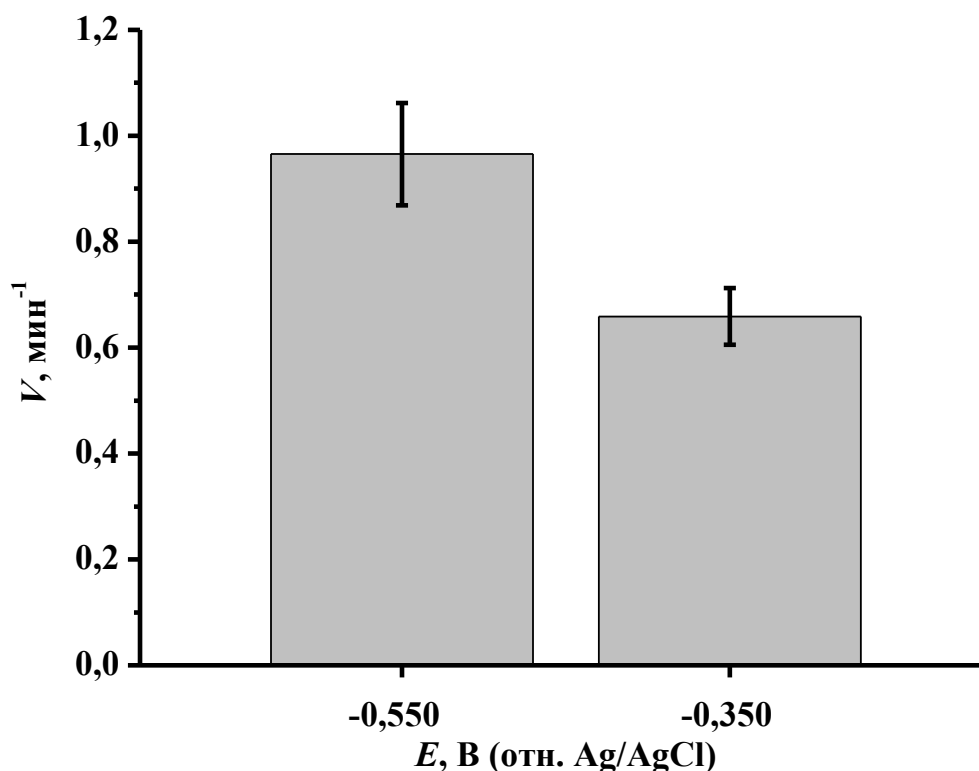


Рисунок 76. Начальные скорости реакции образования 6-гидрохлорзоксазона при различных значениях приложенных потенциалов к рабочим электродам с иммобилизованными бактосомами, при которых проводились электрокаталитические реакции по отношению к хлорзоксазону.

Полученные результаты могут указывать на активирующую роль CPR по отношению к CYP2E1 за счет того, что последний одновременно получает электроны как от электрода, так и от CPR.

Отметим, что V гидроксилирования хлорзоксазона под действием бактосом в электрохимической системе в присутствии каталазы при потенциале восстановления -0,550 В (отн. Ag/AgCl) была 0,97 мин⁻¹ и практически не отличалась от аналогичного параметра в отсутствие каталазы. Это обстоятельство указывает на то, что пероксид водорода не вносит значительного вклада в скорость образования 6-гидрохлорзоксазона. Однако Nerimetla и соавт. регистрировали значительное увеличение активности CYP2C9- и CYP3A4-содержащих бактосом в присутствии каталазы, что, по мнению авторов, могло быть связано с

предотвращением повреждения мембраносвязанного цитохрома P450 и/или CPR образующимися АФК [148]. По-видимому, в нашем случае электрохимическое образование АФК не вносит значительного вклада в повреждение мембраносвязанных CYP2E1 и CPR в составе бактосом.

Таким образом, разработана биэлектродная система для определения активности CYP2E1 по отношению к маркерному субстрату этого фермента хлорзоксазону. Принцип функционирования разработанной системы показан на рисунке 77.

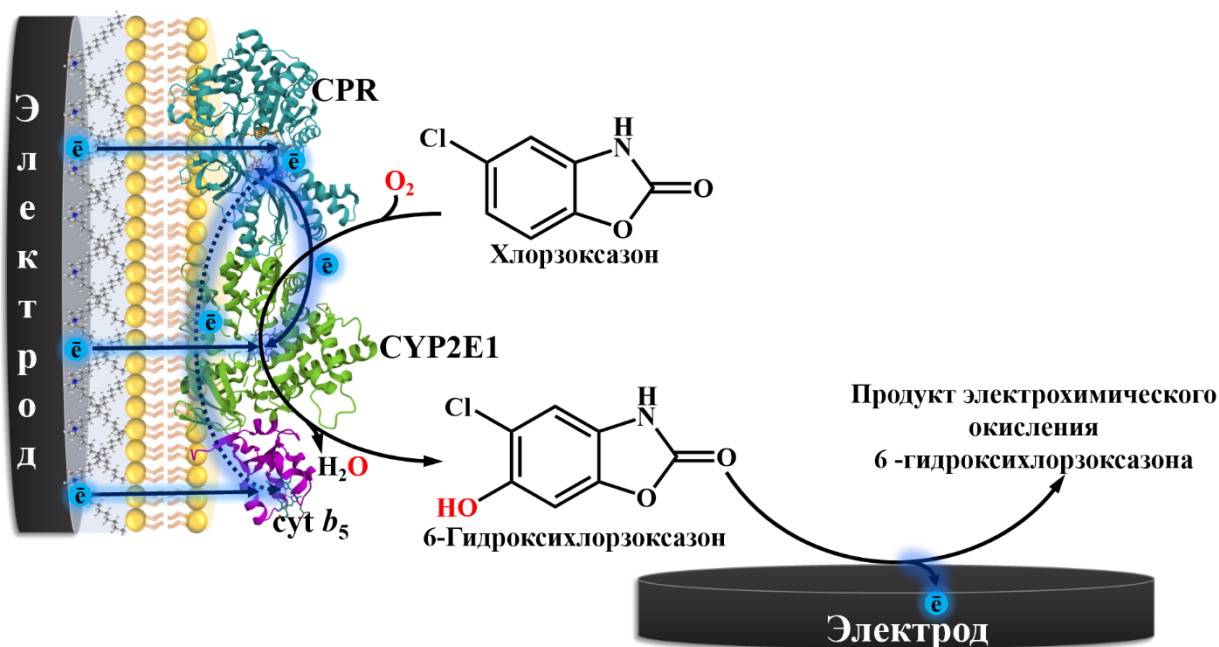


Рисунок 77. Принцип функционирования электрохимической системы для определения активности CYP2E1 в составе бактосом. Один из электродов (на рисунке слева) модифицирован ДДАБ и служит для иммобилизации бактосом и электрохимического восстановления иона железа гема CYP2E1, cyt *b*₅ и флавиновых кофакторов CPR, второй электрод (на рисунке справа) служит для регистрации образующегося из хлорзоксазона в процессе ферментативной реакции 6-гидроксихлорзоксазона путем его прямого электрохимического окисления.

Разработанная биэлектродная система может использоваться при решении задач фармакологии, связанных с определением активности CYP2E1. Также стоит

отметить, что существенным преимуществом разработанного подхода для определения активности бактосом, иммобилизованных на электроде, основанного на использовании биэлектродной стратегии, является отсутствие необходимости многоэтапного процесса выделения образующихся продуктов каталитической реакции. Кроме того, иммобилизация мембраносвязанных ферментов системы цитохрома P450 на электроде позволяет получить более стабильную электрохимическую систему.

3.2. Методы определения метаболитов электрокаталитических цитохром P450-зависимых реакций, основанные на флуоресцентной спектроскопии: электрохимическая система для определения активности CYP3A4 по отношению к гидрокортизону

Несмотря на то, что синтетические флуорогенные субстраты широко используются при решении задач фармакологии, связанных с выявлением ингибиторов цитохромов P450, представляется целесообразным поиск эндогенных соединений как более специфических субстратов, цитохром P450-зависимая биотрансформация которых приводила бы к образованию метаболитов с флуоресцентными свойствами.

В данной части работы нами выявлены различия во флуоресцентных свойствах гидрокортизона и его метаболита 6 β -гидроксикортизола, образующегося при участии CYP3A4. Нами также показана возможность количественного флуоресцентного определения 6 β -гидроксикортизола при исследовании активности CYP3A4, иммобилизованного на электроде.

CYP3A4 участвует в метаболизме примерно 50% всех лекарственных препаратов, что обуславливает особую важность выявления межлекарственных взаимодействий на уровне этого изофермента цитохрома P450 [312]. Ингибирование CYP3A4 может приводить к лекарственной токсичности и возникновению межлекарственных взаимодействий [313]. С другой стороны, снижение активности CYP3A4 может иметь и положительное значение, поскольку

в ряде случаев таким образом можно снизить инактивацию быстро метаболизирующихся препаратов или биологически активных соединений [313, 314]. Следовательно, определение активности CYP3A4 имеет большое значение в фармакологических исследованиях.

CYP3A4 также участвует в метаболизме ряда эндогенных соединений, таких как гидрокортизон, тестостерон, β -эстрадиол и прогестерон [315]. Эндогенные соединения, метаболизм которых осуществляется при участии CYP3A4, могут использоваться как маркерные субстраты при проведении ингибиторного анализа [316].

CYP3A4 катализирует реакцию гидроксилирования гидрокортизона с образованием 6 β -гидроксикортизола (рисунок 78) [317].

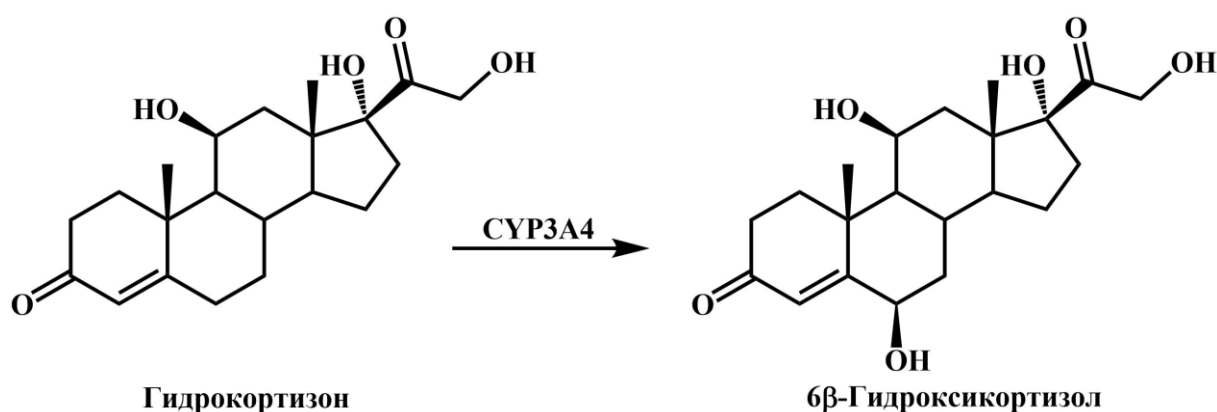


Рисунок 78. Реакция 6 β -гидроксилирования гидрокортизона при участии CYP3A4.

Определение отношения концентрации 6 β -гидроксикортизола к концентрации гидрокортизона в моче используется для оценки функциональной активности CYP3A4 *in vivo* [318] и исследования активности микросом человека [319]. Для количественного определения 6 β -гидроксикортизола и гидрокортизона разработан ряд подходов, основанных на иммуноферментном анализе [320], радиоиммунном анализе [321], ВЭЖХ [322-328] и жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией [329, 330]. Определение стероидов с помощью хромато-масс-спектрометрических методов осложняется низкой

ионизацией этих соединений, что в ряде случаев требует проведения дополнительных этапов химической дериватизации [331, 332].

Хорошо известно, что обработка кортикостероидов сильными кислотами индуцирует реакции протонирования с последующим элиминированием гидроксильных групп и карбокатионные перегруппировки [333, 334], приводящие к образованию флуоресцентных производных, при этом спектры флуоресценции и интенсивность эмиссии зависят от химического строения кортикостероидов [333].

Нами обнаружено, что после обработки гидрокортизона и 6 β -гидроксикортизола смесью 98% серной кислоты и 96% этанола (3:1 по объему) образуются производные, которые при λ_{ex} 365 нм имеют различные спектры флуоресценции. При смешивании 300 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 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 после 10-минутной инкубации полученных растворов при комнатной температуре спектр флуоресценции раствора, содержащего гидрокортизон, в диапазоне 400-600 нм при λ_{ex} 365 нм характеризуется наличием пика эмиссии при λ_{em} 525 $\pm$ 2 нм, а спектр флуоресценции раствора, содержащего 6 β -гидроксикортизол, при аналогичных условиях регистрации спектра флуоресценции характеризуется наличием пика эмиссии при λ_{em} 427 $\pm$ 2 нм (рисунок 79).

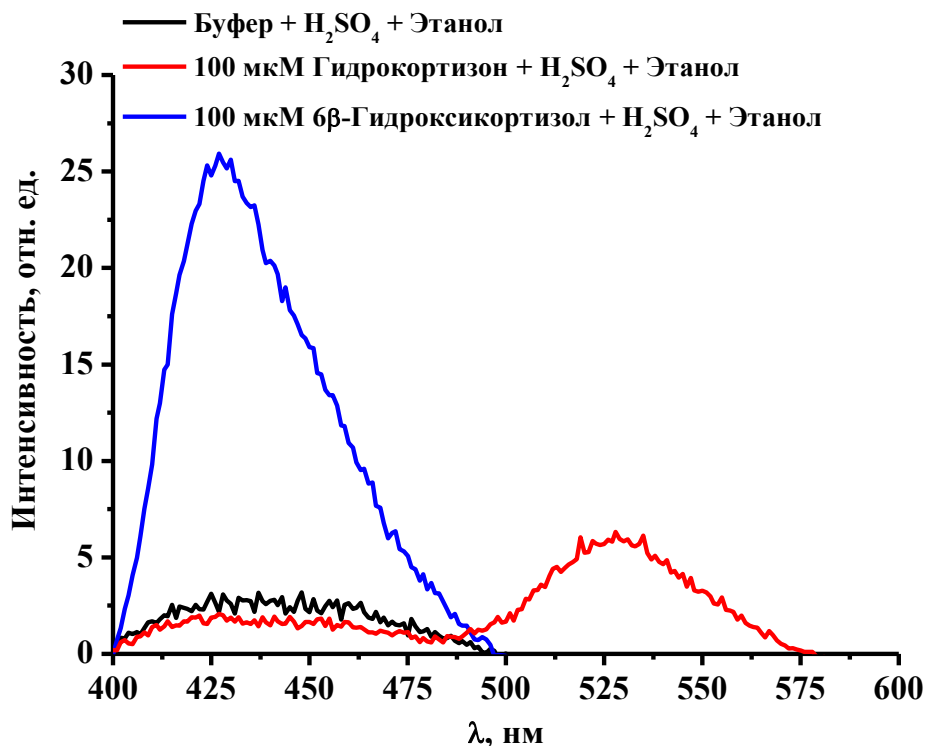


Рисунок 79. Спектры флуоресценции 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол (—) и 100 мкМ гидрокортизон (—) или 100 мкМ 6β-гидрокортизон (—), смешанного с двойным объемом смеси 98% серной кислоты и 96% этанола (3:1 по объему). Спектры были зарегистрированы при λ_{ex} 365 нм.

Мы проанализировали зависимость интенсивности пика эмиссии при λ_{em} 427 нм от концентрации 6β-гидрокортизола в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и 1% (по объему) метанол, после обработки смесью серной кислоты и этанола (рисунок 80 А). Зависимость интенсивности пика эмиссии при λ_{em} 427 нм и λ_{ex} 365 нм от концентрации 6β-гидрокортизола (в диапазоне от 0 до 10 мкМ) имела линейный характер и описывалась уравнением вида: *Интенсивность флуоресценции*, отн. ед. = 2,0828, отн. ед./мкМ × [6β-гидрокортизол], мкМ ($R^2 = 0,9954$, рисунок 80 Б). Предел определяемых концентраций 6β-гидрокортизола данным методом был рассчитан как 320 нМ.

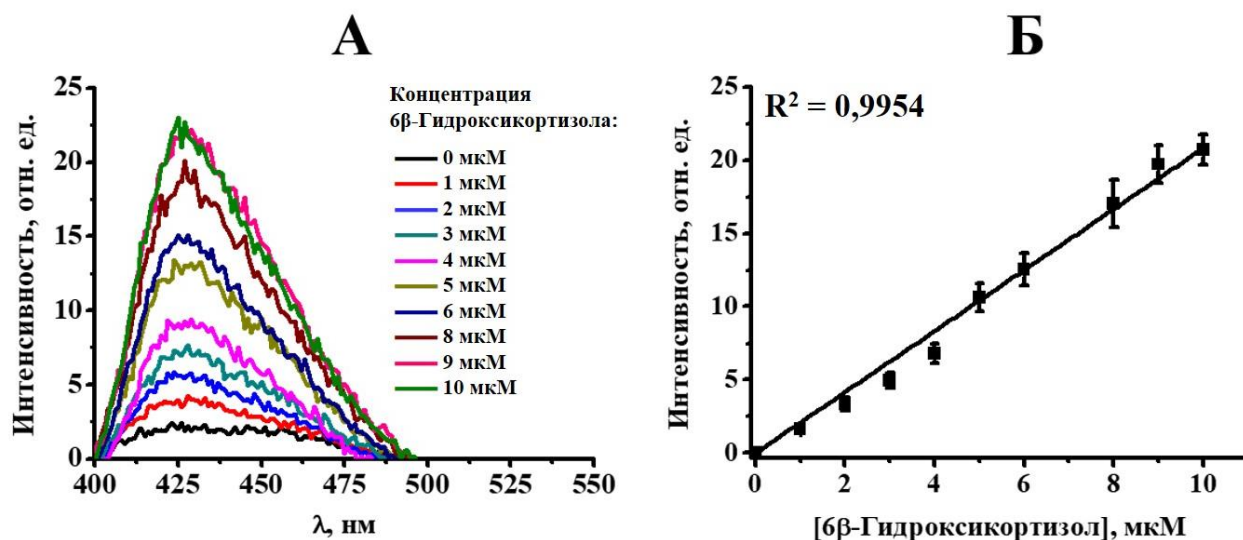


Рисунок 80. Спектры флуоресценции 100 мкМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и различные концентрации 6β-гидрооксикортизола (от 0 до 10 мкМ), смешанного с двойным объемом смеси серной кислоты и этанола (3:1 по объему) (А). Спектры были зарегистрированы при λ_{ex} 365 нм. Зависимость интенсивности пика эмиссии при λ_{em} 427 нм от концентрации 6β-гидрооксикортизола (Б).

Основываясь на возможности флуоресцентного определения 6β-гидрооксикортизола, мы предложили метод исследования активности рекомбинантного СУРЗА4, иммобилизованного на ПГЭ, модифицированном ДДАБ, по отношению к гидрокортизону.

СУРЗА4, иммобилизованный на ПГЭ, модифицированных ДДАБ, был охарактеризован в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl и 1% (по объему) метанол, методом циклической вольтамперометрии (рисунок 81). Как видно на рисунке 81, циклические вольтамперограммы характеризуются наличием пика восстановления и пика окисления иона железа гема фермента. При скорости сканирования 100 мВ/с значения E_c и E_a были определены как $-0,396 \pm 0,007$ В (отн. Ag/AgCl) и $-0,234 \pm 0,004$ В (отн. Ag/AgCl), соответственно. Значение E_m было определено как $-0,315 \pm 0,011$ В (отн. Ag/AgCl). Количество электроактивного СУРЗА4, иммобилизованного на электроде и

потенциально способного участвовать в электрокаталитической реакции было определено в соответствии с уравнением 10 как $0,7 \pm 0,1$ пмоль.

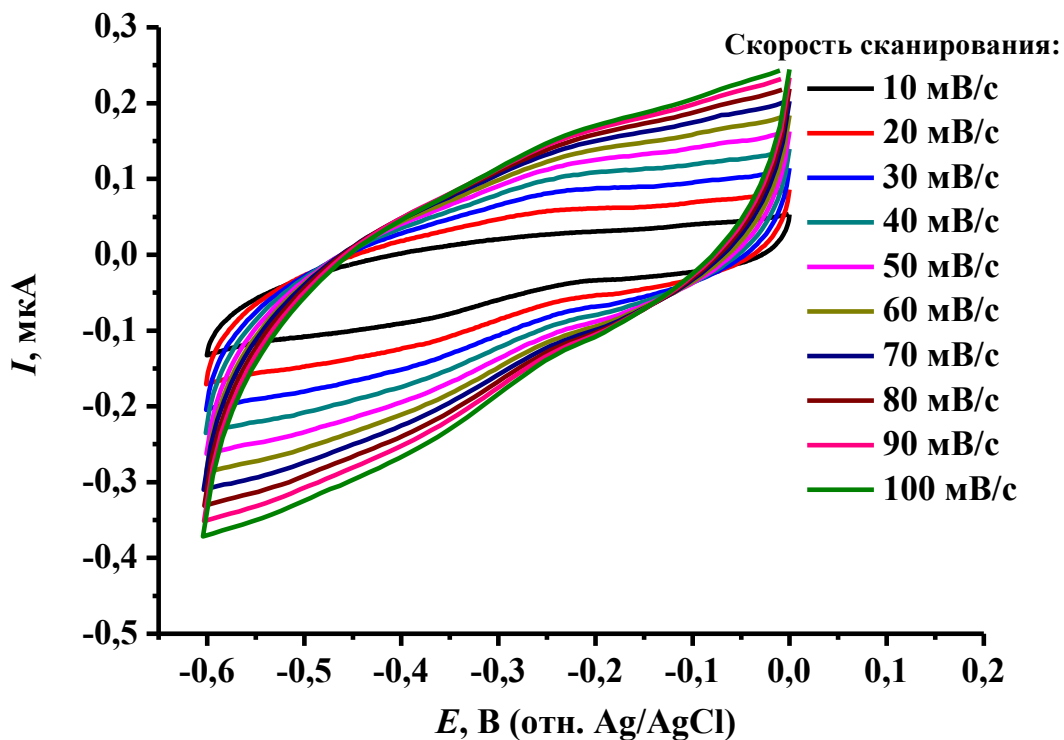


Рисунок 81. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ, модифицированного ДДАБ, и с иммобилизованным СУРЗА4 в насыщенном аргоне 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ NaCl. Скорость сканирования от 10 до 100 мВ/с.

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. 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. Как видно на рисунке 82 А, при λ_{ex} 365 нм спектр флуоресценции инкубационной смеси, обработанной раствором серной кислоты и этанола после проведения СУРЗА4-зависимой электрокаталитической реакции по отношению к гидрокортизону, характеризуется пиком эмиссии при λ_{em} 427 нм, интенсивность которого возрастает от времени электрокаталитической реакции (рисунок 82 А). Данный пик свидетельствует об образовании 6 β -гидроксикортизола. Зависимость количества образующегося 6 β -гидроксикортизола от времени электрокаталитической реакции описывается гиперболой (рисунок 82 Б). При этом, при проведении электрокаталитической реакции без фермента в течение 60 мин интенсивность пика эмиссии при λ_{em} 427 нм значительно меньше интенсивности пика эмиссии при проведении электрокаталитической реакции в течение 60 мин с иммобилизованным на электроде СУРЗА4 (рисунок 82 В).

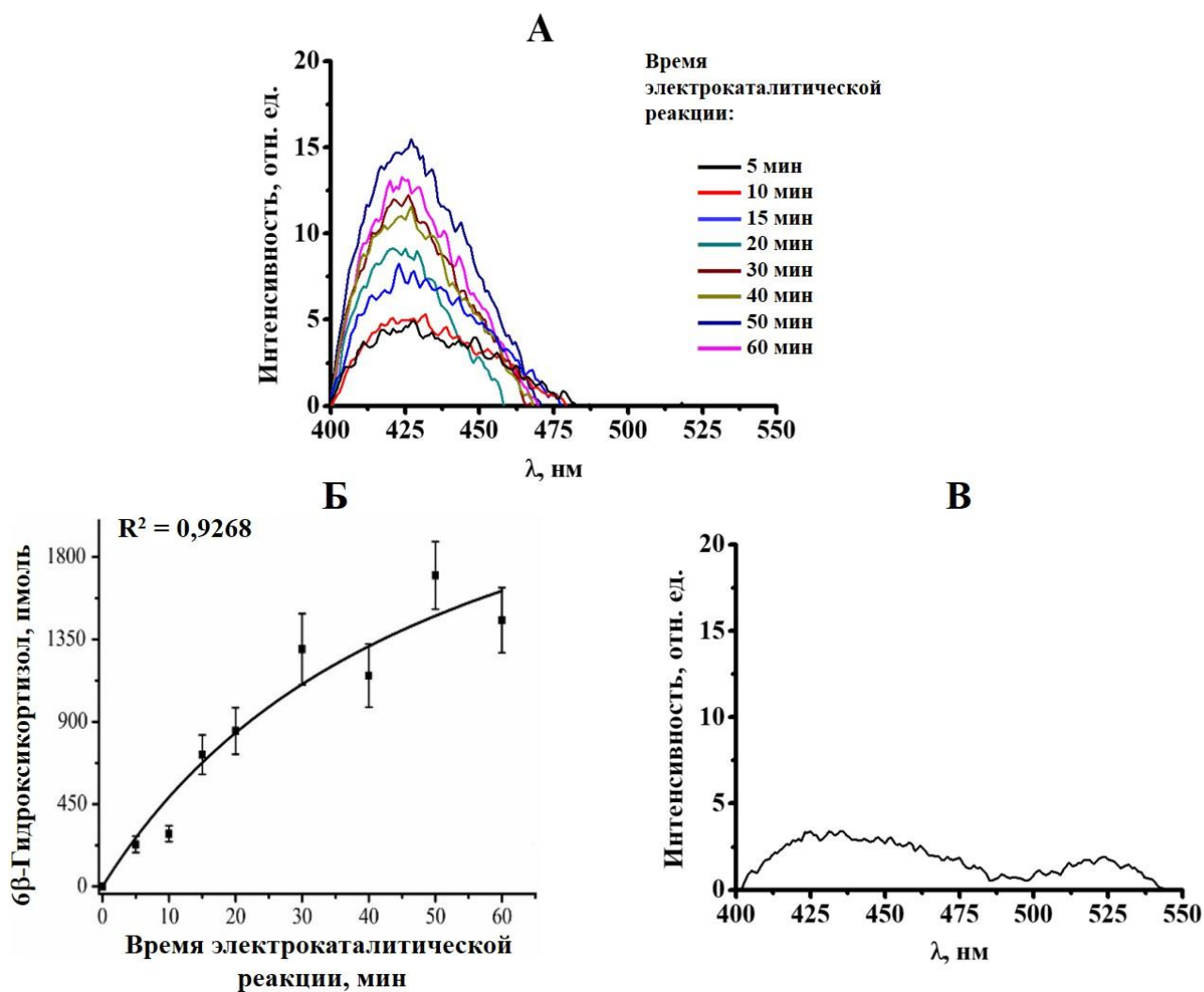


Рисунок 82. Спектры флуоресценции 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% (по объему) метанол и 100 мкМ гидрокортизон, смешанного с двойным объемом смеси серной кислоты и этанола (3:1 по объему), зарегистрированные после проведения электрокаталитической реакции в течение 5-60 мин при фиксированном потенциале -0,6 В (отн. Ag/AgCl) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ и с иммобилизованным СУРЗА4 (А). Зависимость количества образующегося 6 β -гидроксикортизола от времени электрокаталитической реакции (Б). Спектр 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), зарегистрированный после проведения электрокаталитической реакции в течение 60 мин при фиксированном потенциале -0,6 В (отн. Ag/AgCl) рабочего электрода, модифицированного ДДАБ без иммобилизованного СУРЗА4 (В). Спектры были зарегистрированы при λ_{ex} 365 нм.

Мы получили зависимость начальной скорости реакции гидроксилирования гидрокортизона от его концентрации в электрохимической системе при участии СУРЗА4, иммобилизованного на ПГЭ, путем определения 6β-гидрокортизола с помощью флуоресценции (рисунок 83). Указанная зависимость имела гиперболический характер ($R^2 = 0,9691$) и описывалась уравнением вида: $V, \text{мин}^{-1} = ((89,01241 \pm 5,11452), \text{мин}^{-1} \times [\text{Гидрокортизон}], \text{мкМ}) / ((10,02418 \pm 2,02645), \text{мкМ} + [\text{Гидрокортизон}], \text{мкМ})$. 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.

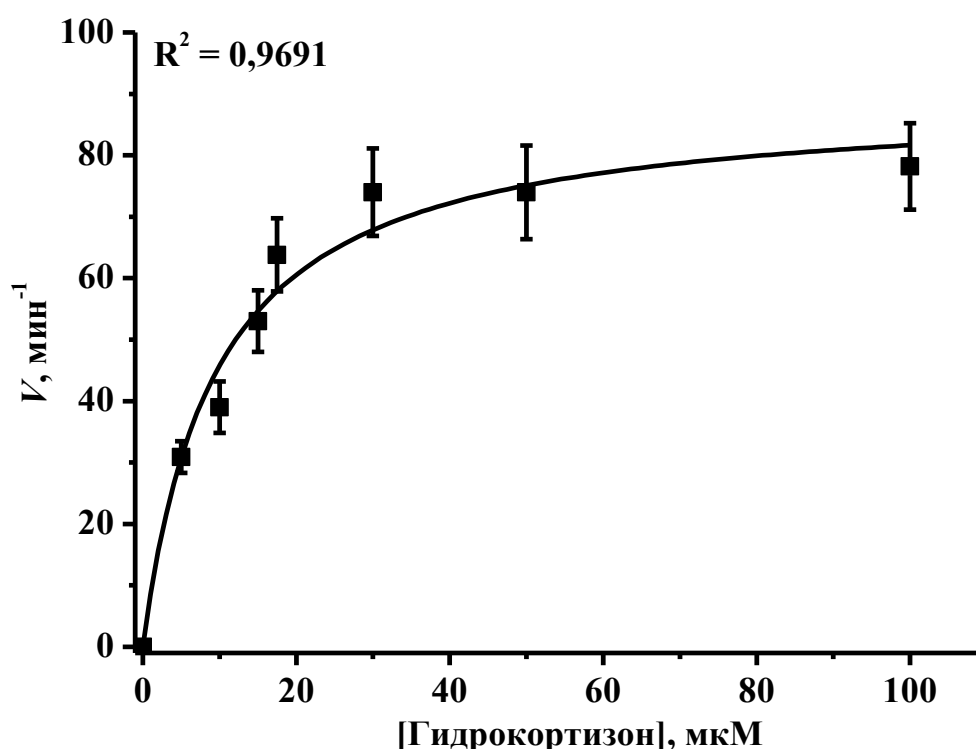


Рисунок 83. Зависимость начальной скорости СУРЗА4-зависимого образования 6β-гидрокортизола от концентрации гидрокортизона в электрохимической системе. Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

Ранее в работе Peng и соавт. с помощью суперсом, экспрессирующих CYP3A4 человека, были определены значения $V_{\max}$ и K_M CYP3A4 по отношению к гидрокортизону как 27 мин^{-1} и $148 \pm 25 \text{ мкМ}$, соответственно [319]. Однако в работе Abel и соавт. с помощью микросом человека было определено значение K_M реакции 6 β -гидроксилирования гидрокортизона, которое составило $15,2 \pm 2,1 \text{ мкМ}$ [335], что близко к полученному нами значению этого параметра.

Чтобы продемонстрировать применимость разработанного нами подхода к определению электрокаталитической активности CYP3A4 путем количественного определения 6 β -гидроксикортизола для скрининга ингибиторов, мы оценили V гидроксилирования гидрокортизона (100 мкМ) под действием CYP3A4 в присутствии различных концентраций кетоконазола (0 - 10000 нМ), являющегося известным ингибитором CYP3A4. Из зависимости остаточной активности CYP3A4 по отношению к гидрокортизону от концентрации кетоконазола, представленной на рисунке 84, было определено значение IC_{50} , составившее $70 \pm 5 \text{ нМ}$.

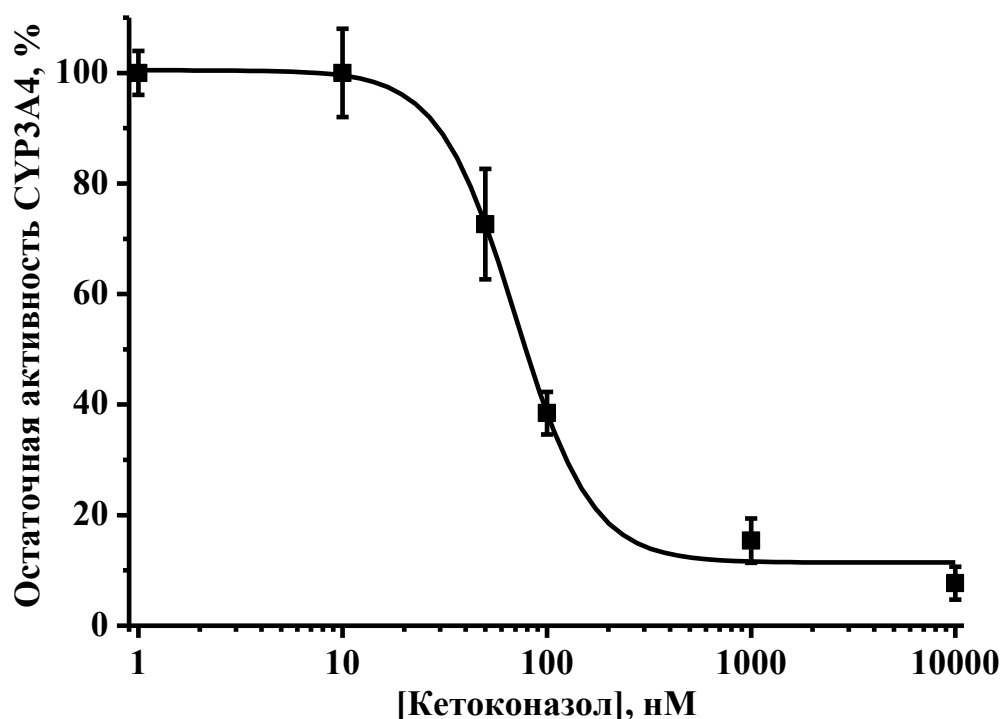


Рисунок 84. Зависимость остаточной активности CYP3A4 по отношению к 100 мкМ гидрокортизону от концентрации кетоконазола (0 - 10000 нМ). Представлены средние значения из 3-5 независимых экспериментов $\pm$ стандартные отклонения.

Ранее было показано, что кетоконазол является ингибитором смешанного типа 6β -гидроксилазной активности ферментов подсемейства CYP3A [336]. Для ингибиторов смешанного типа значение IC_{50} зависит от концентрации субстрата. В работе Abel и соавт. с помощью микросом человека было показано, что при концентрации гидрокортизона 1 мкМ, кетоконазол ингибирует 6β -гидроксилазную активность со значением IC_{50} $0,8 \pm 0,4$ мкМ [335]. В работе Greenblatt и соавт. значения IC_{50} кетоконазола, ингибирующего 6β -гидроксилазную активность по отношению к 50 мкМ и 500 мкМ тестостерону, были определены как 0,03 и 0,056 мкМ, соответственно [336], что сопоставимо с установленным нами аналогичным параметром ингибирующей активности кетоконазола по отношению к 100 мкМ гидрокортизону.

Таким образом, мы показали, что разработанный нами подход к определению электрокаталитической активности CYP3A4 путем количественного определения 6β -гидрокортизола может использоваться для выявления ингибиторов данного фермента.

Перспективным является развитие принципиально схожих систем, в которых цитохром P450 иммобилизован на электроде, а образующиеся в результате биотрансформации субстратов метаболиты могут быть определены методом флуоресцентной спектроскопии. Достоинством таких систем является, прежде всего, отсутствие необходимости реконструирования цитохром P450-содержащей системы и, в идеале, разделения компонентов инкубационной смеси, а также высокая чувствительность определения образующихся метаболитов за счет применения флуоресцентной спектроскопии. Исследования в этой области должны быть направлены на изучение флуоресцентных свойств субстратов индивидуальных изоферментов цитохрома P450 и их метаболитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе предложены и развиты новые методологические подходы для идентификации и количественного определения продуктов цитохром Р450-зависимых реакций. Первый подход основан на электрохимическом определении продуктов ферментативных реакций ароматического гидроксирования, деалкилирования ароматических соединений и ароматизации за счет их прямого электрохимического окисления при потенциалах, отличных от потенциалов окисления субстратов (таблица 7). Основываясь на данном подходе, в работе были получены биелектродные системы, в которых один из электродов служит для иммобилизации и инициирования каталитической реакции индивидуальных рекомбинантных или мембраносвязанных цитохромов Р450, а другой электрод служит для количественного определения образующихся продуктов за счет их прямого электрохимического окисления. Показана возможность успешного применения такой системы при проведении ингибиторного анализа. Разработанный подход позволяет избежать определения параметров стационарной кинетики цитохромов Р450, иммобилизованных на электроде, с помощью регистрации каталитического тока, на величину которого могут влиять как концентрация кислорода в системе, так и вносимых в систему органических соединений, используемых в качестве растворителей для субстратов. Таким образом, разработанный подход определения активности цитохромов Р450 с помощью биелектродных систем является более совершенными, по сравнению с регистрацией каталитического тока, как описано в работах Panicco и соавт. [7], Mie и соавт. [8, 142], Fantuzzi и соавт. [92, 93, 120, 122], Xu и соавт. [94, 136, 160], Wu и соавт. [106, 118], Sun и Wu [118], Yang и соавт. [121], Huang и соавт. [160] и др. Кроме того, существенным преимуществом использования биелектродной электрохимической системы является отсутствие необходимости проведения многоэтапного процесса разделения компонентов инкубационной среды и проведения ВЭЖХ (и/или масс-спектрометрии) с целью количественного определения образующихся продуктов реакций как это осуществлялось ранее в

работах Panicco и соавт. [7, 99], Mie и соавт. [8, 142], Xu и соавт. [94, 136, 160], Nerimetla и соавт. [95, 148], Walgama и соавт. [140], Walker и соавт. [141], Di Nardo и соавт. [225] и др. Показано преимущество использования мембраносвязанных ферментов при конструировании электрохимической системы для определения активности цитохромов P450. Кроме того, установлено, что при иммобилизации CYP2E1-содержащих бактосом на электроде, акцептором электронов от электрода является как CPR, так и CYP2E1 и *cyt b₅*, при этом после электрохимического восстановления флавиновых простетических групп электроны с CPR переносятся на CYP2E1 и/или на *cyt b₅*. Данный механизм переноса электронов отличается от предложенного ранее в работах Sultana и соавт., Nerimetla и соавт., Walgama и соавт., Krishnan и соавт. и др., но согласуется с механизмом, описанным в работе Xu и соавт. Также установлена стимулирующая роль CPR на активность монооксигеназы, по-видимому, реализуемая за счет межмолекулярного переноса электронов.

Второй подход был разработан в диссертационной работе для определения гидроксилазной активности иммобилизованного на электроде CYP3A4 по отношению к маркерному субстрату этого фермента – гидрокортизону. Нами установлено, что 6β-гидроксикортизол, образующийся в результате CYP3A4-зависимой биотрансформации гидрокортизона, после обработки смесью серной кислоты и этанола имеет характеристический пик флуоресценции, отличный от пика флуоресценции гидрокортизона, и, таким образом, может быть количественно определен методом флуоресцентной спектроскопии. Данный подход является важной альтернативой подходу, основанному на использовании биэлектродной системы, поскольку для CYP3A4 имеется ограниченное число субстратов, подвергающихся реакциям ароматического гидроксилирования или деалкилирования, приводящих к образованию продуктов, содержащих электроактивные гидроксифенильные группы, что затрудняет применение электрохимических подходов для идентификации и количественного определения образующихся продуктов.

Все разработанные в настоящей работе подходы могут использоваться для решения задач фармакологии, связанных с выявлением межлекарственных взаимодействий, обусловленных ингибированием изоферментов цитохрома P450.

Изучение электрохимических свойств других субстратов и метаболитов цитохром P450-зависимых реакций, повышение чувствительности электрохимического определения метаболитов с помощью современных материалов для модификации электродов, в том числе на основе углерода, а также создание устройств, позволяющих в автоматическом режиме проводить регистрацию образующихся метаболитов, являются перспективными задачами дальнейшего развития биэлектродных систем для исследования механизмов и кинетики реакций, катализируемых цитохромами P450.

Таблица 7. Электрохимические характеристики субстратов и метаболитов, образующихся в цитохром Р450-зависимых реакциях, зарегистрированные при рН 7,4.

Характеристики, полученные из циклической вольтамперометрии				Характеристики аналитического пика окисления метаболита, полученные из квадратно-волновой вольтамперометрии		
Субстрат	E_a , В	Метаболит	E_a , В	E_a , В	Предел определяемых концентраций, нМ	Чувствительность, мкА/мкМ
Андростендион	-*	Эстрон	0,546 (отн. Ag/AgCl)	0,497 ± 0,014 (отн. Ag/AgCl)	11	0,010
Тестостерон	-*	β-Эстрадиол	0,517 (отн. Ag/AgCl)	0,483 ± 0,017 (отн. Ag/AgCl)	3,4	0,012
(S)-Варфарин	0,820 (отн. Ag/AgCl)	(S)-7-Гидроксиварфарин	0,600 (отн. Ag/AgCl)	0,590 ± 0,020 (отн. Ag/AgCl)	91	0,0075
			0,900 (отн. Ag/AgCl)			
Диклофенак	0,587 (отн. Ag/AgCl)	4'-Гидроксидиклофенак	0,320 (отн. Ag/AgCl)	0,275 ± 0,025 (отн. Ag/AgCl)	120	0,003
	0,992 (отн. Ag/AgCl)			0,110 ± 0,010 (отн. Ag/AgCl) **	85	0,11
(S)-Напроксен	0,850 (отн. Ag)	(S)-Десметилнапроксен	0,492 (отн. Ag)	0,400 ± 0,020 (отн. Ag)	290	0,023
	1,035 (отн. Ag)		0,762 (отн. Ag)			
			1,129 (отн. Ag)			
Фенитоин	-*	4-Гидроксифенитоин	0,595 (отн. Ag)	0,602 ± 0,018 (отн. Ag)	40	0,062
Хлорзоксазон	0,892 В (отн. Ag/AgCl)	6-Гидроксихлорзоксазон	0,207 (отн. Ag/AgCl)	0,203 ± 0,022 (отн. Ag/AgCl)	110	0,016
	0,972 В (отн. Ag/AgCl)		0,891 В (отн. Ag/AgCl)			
			1,114 В (отн. Ag/AgCl)			

Примечание: * Не зарегистрировано пика окисления в диапазоне потенциалов от 0 до 1,2 В.

** Потенциалы зарегистрированы с помощью ПГЭ, модифицированных ОУНТ.

Таблица 8. Параметры стационарной кинетики исследуемых цитохромов Р450, полученные с помощью разработанных биэлектродных и альтернативных ферментативных систем.

Цитохром Р450	Субстрат	Электрохимическая система					Альтернативные системы*				
		Характер зависимости начальной скорости от концентрации субстрата (кинетический профиль)	$V_{\max 1}$, мин ⁻¹	K_{M1} , мкМ	$V_{\max 1}/K_{M1}$, мин ⁻¹ мкМ ⁻¹	$V_{\max 2}/K_{M2}$, мин ⁻¹ мкМ ⁻¹	Характер зависимости начальной скорости от концентрации субстрата (кинетический профиль)	$V_{\max 1}$, мин ⁻¹	K_{M1} , мкМ	$V_{\max 1}/K_{M1}$, мин ⁻¹ мкМ ⁻¹	$V_{\max 2}/K_{M2}$, мин ⁻¹ мкМ ⁻¹
CYP19A1	Андростен-дион	Гиперболический	51,6 ± 7,2	4,2 ± 1,5	12,29	-	Гиперболический	3,6 ± 0,18	0,044 ± 0,006	81,82	-
	Тестостерон	Гиперболический	10,2 ± 1,2	3,8 ± 1,3	2,68	-	Гиперболический	н.о.	0,023 ± 0,004	н.о.	-
CYP2C9	(S)-Варфарин	Гиперболический	0,100 ± 0,002	3,03 ± 0,38	0,033	-	Гиперболический	0,0641-1,8	2,5-18	0,0122-0,61	-
	Диклофенак	Гиперболический	5,35 ± 0,13	11,66 ± 0,92	0,46	-	Гиперболический	14,8-37,2	2,33-30	0,9-11,71	-
	(S)-Напроксен	Гиперболический	0,98 ± 0,03	331 ± 30	0,003	-	Бифазный	1,39-12,03	56-248	0,01-0,215	0,002-0,05
							Гиперболический	4,9-31,7	116-419	0,022-0,11	-
CYP2C19	Фенитоин	Бифазный	0,094 ± 0,002	25,8 ± 2,0	0,0036	0,00042	Бифазный	0,085	24,1	0,0035	0,00029
CYP2E1	Хлорзоксазон	Гиперболический	1,64 ± 0,08	78 ± 9	0,021	-	Гиперболический	9,3**	75**	0,124**	-

Продолжение таблицы 8

Примечание: *Диапазон значений указан в соответствии с данными, представленными в литературе. Ссылки приведены в тексте.

**Параметры заявлены производителем бактосом, содержащих CYP2E1, CPR и cyt b_5 .

н.о. – параметр не определялся.

Полужирным отмечены значения параметров стационарной кинетики, полученные с помощью биэлектродной электрохимической системы, попадающие в диапазон значений аналогичных параметров, полученных ранее с помощью альтернативных ферментативных систем.

ВЫВОДЫ

1. Проведено исследование электрохимических свойств андростендиона, тестостерона, (S)-варфарина, диклофенака, (S)-напроксена, фенитоина и хлорзоксазона и продуктов их соответствующих цитохром P450-зависимых реакций: эстрона, 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 P450, а другой электрод служит для идентификации и количественного определения образующихся эстрона и β -эстрадиола под действием CYP19A1, (S)-7-гидроксиварфарина, 4'-гидроксидиклофенака и (S)-О-десметилнапроксена под действием CYP2C9, гидроксифенитоина под действием CYP2C19 и 6-гидроксихлорзоксазона под действием CYP2E1 из соответствующих субстратов.
3. Кинетические профили реакций ароматизации андростендиона и тестостерона, протекающих под действием иммобилизованного на электроде CYP19A1, 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 CYP2C9, 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-деметилования (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 $V_{\max 1}$, K_{M1} , $V_{\max 1}/K_{M1}$ и $V_{\max 2}/K_{M2}$ 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 гидроксилирования 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: $V_{\max}$ $1,64 \pm 0,08 \text{ мин}^{-1}$, K_M $78 \pm 9 \text{ мкМ}$ и $V_{\max}/K_M$ $0,021 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$. 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 -гидрооксикортизол, являющийся продуктом СУР3А4-зависимого гидроксилирования гидрокортизона, после обработки смесью серной кислоты и этанола имеет характеристический пик флуоресценции при λ_{em} $427 \pm 2 \text{ нм}$ (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 $89 \pm 5 \text{ мин}^{-1}$, $10 \pm 2 \text{ мкМ}$ и $8,9 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$, соответственно.

8. На примере ингибирования CYP19A1 эземестаном, CYP2C9 сульфafenазолом, CYP2C19 флуконазолом и CYP3A4 кетоконазолом показана возможность применения разработанных систем для исследования ингибиторов указанных цитохромов P450.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТХ	–	Анатомо-Терапевтически-Химическая классификация
АФК	–	активные формы кислорода
ВЭЖХ	–	высокоэффективная жидкостная хроматография
ДДАБ	–	дидодецилдиметиламмония бромид
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	–	комплементарная ДНК
МУНТ	–	многостенные углеродные нанотрубки
НВЭ	–	нормальный водородный электрод
НКЭ	–	насыщенный каломельный электрод
НПВП	–	нестероидные противовоспалительные препараты
НПВС	–	нестероидные противовоспалительные соединения
Отн.	–	относительно
Отн. ед.	–	относительные единицы
ОУНТ	–	одностенные углеродные нанотрубки
ПГЭ	–	печатный графитовый электрод
ПДДА	–	поли(диаллилдиметиламмония хлорид)
ПСС	–	полистиролсульфонат
СУЭ	–	стеклоуглеродный электрод
СЭМ	–	сканирующая электронная микроскопия
ЭДТА	–	этилендиаминтетрауксусная кислота
CHAPS	–	3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]пропан-1-сульфонат
CPR	–	цитохром P450 редуктаза
CYP	–	цитохром P450
CYP1A2	–	цитохром P450 1A2
CYP2A6	–	цитохром P450 2A6
CYP2B4	–	цитохром P450 2B4

CYP2B6	– цитохром P450 2B6
CYP2C9	– цитохром P450 2C9
CYP2C9*1	– дикий тип цитохрома P450 2C9
CYP2C9*2	– мутантная форма цитохрома P450 2C9 с аминокислотной заменой R144C
CYP2C9*3	– мутантная форма цитохрома P450 2C9 с аминокислотной заменой I359L
CYP2D6	– цитохром P450 2D6
CYP2D6*1	– дикий тип цитохрома P450 2D6
CYP2D6*17	– мутантная форма цитохрома P450 2D6 с аминокислотными заменами T107I, R296C и S486T
CYP2D6*2	– мутантная форма цитохрома P450 2D6 с аминокислотными заменами R296C и S486T
CYP2E1	– цитохром P450 2E1
CYP2J2	– цитохром P450 2J2
CYP3A4	– цитохром P450 3A4
CYP3A5	– цитохром P450 3A5
CYP5A1	– цитохром P450 5A1, тромбоксан синтаза
CYP6A1	– цитохром P450 6A1
cyt b_5	– цитохром b_5
D	– коэффициент диффузии
e	– основание натурального логарифма
E	– приложенный потенциал
E	– фермент
$\bar{e}$	– электрон
$E^{0'}$	– формальный потенциал
E_a	– потенциал пика окисления (анодного пика)
E_c	– потенциал пика восстановления (катодного пика)
E_{eq}	– равновесный потенциал

E_I	– фермент-ингибиторный комплекс
$E-I^*$	– прочный комплекс ингибитора с ферментом
E_m	– средний потенциал или полупотенциал пиков
E_{onset}	– потенциал начала катализа
E_p	– потенциал пика
$E_{p/2}$	– потенциал полупика
ES	– фермент-субстратный комплекс
F	– постоянная Фарадея
FAD	– флавинадениндинуклеотид
FMN	– флавинмоноклеотид
FMO	– флавинсодержащая монооксигеназа
$FMO1$	– флавинсодержащая монооксигеназа, изоформа 1
$FMO3$	– флавинсодержащая монооксигеназа, изоформа 3
g	– относительное центробежное ускорение
I	– ингибитор
I	– ток
I^*	– высокореакционный продукт реакции ингибитора с ферментом
IC_{50}	– концентрация ингибитора, при которой активность фермента уменьшается на 50%
I_{cat}	– каталитический ток
I_E	– ток, связанный с межфазным переносом электронов
I_L	– предельный ток
I_{Lev}	– ток Левича
I_{max}	– максимальный каталитический ток
I_p	– ток пика восстановления или окисления вещества
k_1	– константа скорости прямой реакции
k_{-1}	– константа скорости обратной реакции

k_2	— константа скорости превращение фермент-ингибиторного комплекса в интермедиат
k_3	— константа скорости распада интермедиата фермент-ингибиторного комплекса до фермента и высокореакционного продукта
k_4	— константа скорости образования прочного комплекса ингибитора с ферментом
k_a	— гетерогенная константа скорости переноса электронов для окислительного процесса
k_c	— гетерогенная константа скорости переноса электронов для восстановительного процесса
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
k_s	— стандартная гетерогенная константа скорости переноса электронов
$\ln$	— натуральный логарифм
$\log$	— логарифм
MUT261	— мутантная форма цитохрома P450 2E1 с аминокислотными заменами C268S, C480S, C488S

MUT268	– мутантная форма цитохрома P450 2E1 с аминокислотными заменами C261S, C480S, C488S
n	– число электронов, участвующих в электрохимической реакции
NADP ⁺	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный
NADPH	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
Ox	– окисленная форма вещества
P	– продукт реакции
PEG	– полиэтиленгликоль
pH	– отрицательный десятичный логарифм активности H ₃ O ⁺ ионов
pK _a	– отрицательный десятичный логарифм константы кислотности
Q	– заряд
QCM	– quartz crystal microbalance, кварцевые кристаллические микровесы
R	– универсальная газовая постоянная
R ²	– коэффициент детерминации
Red	– восстановленная форма вещества
RH	– субстрат реакции
RON	– продукт реакции
S	– субстрат
T	– абсолютная температура
$t_{1/2}$	– 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

$V_{\max 2}$	– максимальная скорость реакции для низкоаффинной формы фермента
α	– коэффициент переноса (доля перенапряжения)
Γ_0	– поверхностная концентрация электроактивного вещества на электроде
Γ_{ox}	– поверхностная концентрация окисленной формы вещества
Γ_{red}	– поверхностная концентрация восстановленной формы вещества
ε	– коэффициент поглощения
η	– перенапряжение
λ	– длина волны
λ_{em}	– длина волны пика эмиссии
λ_{ex}	– длина волны возбуждения
ν	– скорость сканирования
ν	– кинематическая вязкость раствора
σ	– стандартное отклонение
ω	– частота вращения дискового электрода
[EI]	– интермедиат превращения фермент-ингибиторного комплекса
[I]	– концентрация ингибитора
[S]	– концентрация субстрата
[X]	концентрация вещества X

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gilardi G. Cytochromes P450 redox activity // Encyclopedia of interfacial chemistry / edited by Wandelt K. – Elsevier, The Netherlands, 2018. – V. 7.1. - P. 90–109.
2. Sadeghi S.J., Fantuzzi A., Gilardi G. Breakthrough in P450 bioelectrochemistry and future perspectives // Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics. – 2011. – V. 1814. – №. 1. – P. 237-248.
3. Li Z., Jiang Y., Guengerich F.P., Ma L., Li S., Zhang W. Engineering cytochrome P450 enzyme systems for biomedical and biotechnological applications // J. Biol. Chem. – 2020. – V. 295. – №. 3. – P. 833-849.
4. Krishnan S. Bioelectrodes for evaluating molecular therapeutic and toxicity properties // Curr. Opin. Electrochem. – 2020. – V. 19. – P. 20-26.
5. Kumar N., He J., Rusling J.F. Electrochemical transformations catalyzed by cytochrome P450s and peroxidases // Chem. Soc. Rev. – 2023. – V. 52. – P. 5135-5171.
6. Schneider E., Clark D.S. Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors // Biosens. Bioelectron. – 2013. – V. 39. – №. 1. – P. 1-13.
7. Panicco P., Dodhia V.R., Fantuzzi A., Gilardi G. Enzyme-based amperometric platform to determine the polymorphic response in drug metabolism by cytochromes P450 // Anal. Chem. – 2011. – V. 83. – №. 6. – P. 2179-2186.
8. Mie Y., Tateyama E., Komatsu Y. p-Aminothiophenol modification on gold surface improves stability for electrochemically driven cytochrome P450 microsome activity // Electrochim Acta. – 2014. – V. 115. – P. 364-369.
9. de Rond T., Gao J., Zargar A., de Raad M., Cunha J., Northen T.R., Keasling J.D. A high-throughput mass spectrometric enzyme activity assay enabling the discovery of cytochrome P450 biocatalysts // Angew. Chem. – 2019. – V. 131. – №. 30. – P. 10220-10225.

10. Lim K.B., Özbal C.C., Kassel D.B. Development of a high-throughput online solid-phase extraction/tandem mass spectrometry method for cytochrome P450 inhibition screening // *J. Biomol. Screening.* – 2010. – V. 15. – №. 4. – P. 447-452.
11. Hrycay E.G., Bandiera S.M. Monooxygenase, peroxidase and peroxygenase properties and reaction mechanisms of cytochrome P450 enzymes // *Monooxygenase, peroxidase and peroxygenase properties and mechanisms of cytochrome P450* / edited by Hrycay E.G., Bandiera S.M. – Springer International Publishing, Switzerland, 2015. – Ch. 1. – P. 1-61.
12. Minerdi D., Savoi S., Sabbatini P. Role of cytochrome P450 enzyme in plant microorganisms' communication: a focus on grapevine // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V. 24. – №. 5. – P. 4695.
13. Lynch T., Price A.M.Y. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects // *Am. Fam. Physician.* – 2007. – V. 76. – №. 3. – P. 391-396.
14. Baston E., Leroux F.R. Inhibitors of steroidal cytochrome P450 enzymes as targets for drug development // *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discovery.* – 2007. – V. 2. – №. 1. – P. 31-58.
15. Spinello A., Ritacco I., Magistrato A. The catalytic mechanism of steroidogenic cytochromes P450 from all-atom simulations: entwinement with membrane environment, redox partners, and post-transcriptional regulation // *Catalysts.* – 2019. – V. 9. – №. 1. – P. 81.
16. Karimaa M., Riikonen R., Kettunen H., Taavitsainen P., Ramela M., Chrusciel M., Karlsson S., Rummakko P., Simola O., Wohlfahrt G., Hakulinen P., Vuorela A., Joensuu H., Utriainen T., Fizazi K., Oksala R.. First-in-class small molecule to inhibit CYP11a1 and steroid hormone biosynthesis // *Mol. Cancer Ther.* – 2022. – V. 21. – №. 12. – P. 1765-1776.
17. Brixius-Anderko S., Scott E.E. Structure of human cortisol-producing cytochrome P450 11B1 bound to the breast cancer drug fadrozole provides insights for drug design // *J. Biol. Chem.* – 2019. – V. 294. – №. 2. – P. 453-460.

18. Hoyt S.B., Taylor J., London C., Ali A., Ujjainwalla F., Tata J., Struthers M., Cully D., Wisniewski T., Ren N., Bopp Ch., Sok A., Verras A., McMasters D., Chen Q., Tung E., Tang W., Salituro G., Clemas J., Zhou G., MacNeil D., Duffy R., Xiong Y. Discovery of indazole aldosterone synthase (CYP11B2) inhibitors as potential treatments for hypertension // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2017. – V. 27. – №. 11. – P. 2384-2388.
19. Meguro M., Miyauchi S., Kanao Y., Naito S., Suzuki K., Inoue S., Yamada K., Homma T., Chiba K., Nara F., Furuzono S. 4-Anilino-pyrimidine, novel aldosterone synthase (CYP11B2) inhibitors bearing pyrimidine structures // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2017. – V. 27. – №. 9. – P. 1902-1906.
20. Guengerich F.P. Cytochrome P450 enzymes as drug targets in human disease // *Drug Metab. Dispos.* – 2023. – P. DMD-MR-2023-001431.
21. Abuhammad A. Cholesterol metabolism: a potential therapeutic target in *Mycobacteria* // *Br. J. Pharmacol.* – 2017. – V. 174. – №. 14. – P. 2194-2208.
22. Singh A., Swapnil S., Kanika V., Sarvesh P. CYP51: a potential target // *Nov. Approaches Drug Des. Dev.* – 2017. – V. 2. – №. 1. – P. 6-9.
23. Kaluzhskiy L.A., Ershov P.V., Yablokov E.O. Mezentsev Y.V., Gnedenko O.V., Shkel T.V., Gilep A.A., Usanov S.A., Ivanov A.S. Screening of potential non-azole inhibitors of lanosterol 14- α demethylase (CYP51) of the *Candida* fungi // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.* – 2021. – V. 15. – №. 3. – P. 215–223.
24. Machalz D., Pach S., Bermudez M., Bureik M., Wolber G. Structural insights into understudied human cytochrome P450 enzymes // *Drug Discovery Today.* – 2021. – V. 26. – №. 10. – P. 2456-2464.
25. Li Z., Jiang Y., Guengerich F.P., Ma L., Li S., Zhang W. Engineering cytochrome P450 enzyme systems for biomedical and biotechnological applications // *J. Biol. Chem.* – 2020. – V. 295. – №. 3. – P. 833-849.
26. Rao Gajula S.N., Pillai M.S., Samanthula G., Sonti R. Cytochrome P450 enzymes: a review on drug metabolizing enzyme inhibition studies in drug discovery and development // *Bioanalysis.* – 2021. – V. 13. – №. 17. – P. 1355-1378.
27. Li S., Du L., Bernhardt R. Redox partners: function modulators of bacterial P450 enzymes // *Trends Microbiol.* – 2020. – V. 28. – №. 6. – P. 445-454.

28. Chen C.C., Min J., Zhang L., Yang Y., Yu X., Guo R.T. Advanced understanding of the electron transfer pathway of cytochrome P450s // *ChemBioChem*. – 2021. – V. 22. – №. 8. – P. 1317-1328.
29. Waskell L., Kim J.-J.P. Electron transfer partners of cytochrome P450 // *Cytochrome P450. Structure, mechanism, and biochemistry* / edited by Ortiz de Montellano P.R. – 4th edition. – University of California, San Francisco California, USA, 2015. – Part I, V. 1, Ch. 2. – P. 33-68.
30. Schenkman J.B., Jansson I. Interactions between cytochrome P450 and cytochrome b_5 // *Drug Metab. Rev.* – 1999. – V. 31. – №. 2. – P. 351-364.
31. Porter T.D. The roles of cytochrome b_5 in cytochrome P450 reactions // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* – 2002. – V. 16. – №. 6. – P. 311-316.
32. Schenkman J.B., Jansson I. The many roles of cytochrome b_5 // *Pharmacol. Ther.* – 2003. – V. 97. – №. 2. – P. 139-152.
33. Estrada D.F., Laurence J.S., Scott E.E. Substrate-modulated cytochrome P450 17A1 and cytochrome b_5 interactions revealed by NMR // *J. Biol. Chem.* – 2013. – V. 288. – №. 23. – P. 17008-17018.
34. Imaoka S., Imai Y., Shimada T., Funae Y. Role of phospholipids in reconstituted cytochrome P 450 3A form and mechanism of their activation of catalytic activity // *Biochemistry*. – 1992. – V. 31. – №. 26. – P. 6063-6069.
35. Park J.W., Reed J.R., Brignac-Huber L.M., Backes W.L. Cytochrome P450 system proteins reside in different regions of the endoplasmic reticulum // *Biochem. J.* – 2014. – V. 464. – №. 2. – P. 241-249.
36. Zhang M., Huang R., Im S.C., Waskell L., Ramamoorthy A. Effects of membrane mimetics on cytochrome P450-cytochrome b_5 interactions characterized by NMR spectroscopy // *J. Biol. Chem.* – 2015. – V. 290. – №. 20. – P. 12705-12718.
37. Brignac-Huber L.M., Park J.W., Reed J.R., Backes W.L. Cytochrome P450 organization and function are modulated by endoplasmic reticulum phospholipid heterogeneity // *Drug Metab. Dispos.* – 2016. – V. 44. – №. 12. – P. 1859-1866.
38. Chefson A., Auclair K. Progress towards the easier use of P450 enzymes // *Mol. BioSyst.* – 2006. – V. 2. – №. 10. – P. 462-469.

39. Hrycay E.G., Bandiera S.M. Involvement of cytochrome P450 in reactive oxygen species formation and cancer // *Adv. Pharmacol.* – 2015. – V. 74. – P. 35-84.
40. Ortiz de Montellano P.R. Substrate oxidation by cytochrome P450 enzymes // *Cytochrome P450. Structure, mechanism, and biochemistry* / 4th edition. – University of California, San Francisco California, USA, 2015. – Part I, V. 1, Ch. 4. – P. 111-176.
41. Mak P.J., Denisov I.G. Spectroscopic studies of the cytochrome P450 reaction mechanisms // *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics.* – 2018. – V. 1866. – №. 1. – P. 178-204.
42. Guengerich F.P., Yoshimoto F.K. Formation and cleavage of C–C bonds by enzymatic oxidation–reduction reactions // *Chem. Rev.* – 2018. – V. 118. – №. 14. – P. 6573-6655.
43. Guengerich F.P. Mechanisms of cytochrome P450-catalyzed oxidations // *ACS Catal.* – 2018. – V. 8. – №. 12. – P. 10964-10976.
44. Rabe K.S., Gandubert V.J., Spengler M., Erkelenz M., Niemeyer C.M. Engineering and assaying of cytochrome P450 biocatalysts // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2008. – V. 392. – P. 1059-1073.
45. Ung Y.T., Ong C.E., Pan Y. Current high-throughput approaches of screening modulatory effects of xenobiotics on cytochrome P450 (CYP) enzymes // *High-Throughput.* – 2018. – V. 7. – №. 4. – P. 29.
46. Li H., Sheng Y., Li W., Yuan L. Recent advances in molecular fluorescent probes for CYP450 sensing and imaging // *Chemosensors.* – 2022. – V. 10. – №. 8. – P. 304.
47. De Bock L., Castele S.R.V., Mulliez S.M., Boussery K., Van Bocxlaer J.F. *In vitro* cytochrome P450 activity: development and validation of a sensitive high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the quantification of six probe metabolites after derivatization with pyridine-3-sulfonyl chloride in an aqueous environment // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – V. 1218. – №. 6. – P. 793-801.

48. Deng P., Zhan Y., Chen X., Zhong D. Derivatization methods for quantitative bioanalysis by LC–MS/MS // *Bioanalysis*. – 2012. – V. 4. – №. 1. – P. 49-69.
49. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction // *Biochem. J.* – 1953. – V. 55. – №3. – P. 416-421.
50. Kobayashi K., Yamamoto T., Taguchi M., Chiba K. High-performance liquid chromatography determination of N-and O-demethylase activities of chemicals in human liver microsomes: application of postcolumn fluorescence derivatization using Nash reagent // *Anal. Biochem.* – 2000. – V. 284. – №. 2. – P. 342-347.
51. Davydova N.Y., Hutner D.A., Gaither K.A., Singh D.K., Prasad B., Davydov D.R. High-throughput assay of cytochrome P450-dependent drug demethylation reactions and its use to re-evaluate the pathways of ketamine metabolism // *Biology*. – 2023. – V. 12. – №. 8. – P. 1055.
52. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Usanov S.A., Schmid R.D., Nicolini C., Archakov A.I. Construction and characterization of bioelectrocatalytic sensors based on cytochromes P450 // *J. Inorg. Biochem.* – 2001. – V. 87. – №. 4. – P. 185-190.
53. Donato M.T., Jiménez N., Castell J.V., Gómez-Lechón M.J. Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes // *Drug Metab. Dispos.* – 2004. – V. 32. – №. 7. – P. 699-706.
54. Kenaan C., Zhang H., Hollenberg P.F. High-throughput fluorescence assay for cytochrome P450 mechanism-based inactivators // *Cytochrome P450 Protocols* / edited by Phillips I.R., Shephard E.A., Ortiz de Montellano P.R. – 3rd edition. – Springer Science+Business Media New York, USA, 2013. – Ch. 5. – P. 61-69.
55. Donato M.T., Gómez-Lechón M.J. Fluorescence-based screening of cytochrome P450 activities in intact cells // *Cytochrome Protocols* / edited by Phillips I.R., Shephard E.A., Ortiz de Montellano P.R. – 3rd edition. – Springer Science+Business Media New York, USA, 2013. – Ch. 12. – P. 135-148.
56. Cheng Q., Guengerich F.P. High-throughput fluorescence assay of cytochrome P450 3A4 // *Cytochrome P450 Protocols* / edited by Phillips I.R., Shephard

E.A., Ortiz de Montellano P.R. – 3rd edition. – Springer Science+Business Media New York, USA, 2013. – Ch. 14. – P. 157-162.

57. Burke M.D., Thompson S., Elcombe C.R., Halpert J., Haaparanta T., Mayer R.T. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450 // *Biochem. Pharmacol.* – 1985. – V. 34. – №. 18. – P. 3337-3345.

58. Stresser D.M., Turner S.D., Blanchard A.P., Miller V.P., Crespi C.L. Cytochrome P450 fluorometric substrates: identification of isoform-selective probes for rat CYP2D2 and human CYP3A4 // *Drug Metab. Dispos.* – 2002. – V. 30. – №. 7. – P. 845-852.

59. White I.N.H. A continuous fluorometric assay for cytochrome P-450-dependent mixed function oxidases using 3-cyano-7-ethoxycoumarin // *Anal. Biochem.* – 1988. – V. 172. – №. 2. – P. 304-310.

60. Venhorst J., Onderwater R.C., Meerman J.H., Vermeulen N.P., Commandeur J.N. Evaluation of a novel high-throughput assay for cytochrome P450 2D6 using 7-methoxy-4-(aminomethyl)-coumarin // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2000. – V. 12. – №. 2. – P. 151-158.

61. Chauret N., Dobbs B., Lackman R.L., Bateman K., Nicoll-Griffith D.A., Stresser D.M., Ackermann J.M., Turner S.D., Miller V.P., Crespi C.L. The use of 3-[2-(N, N-diethyl-N-methylammonium) ethyl]-7-methoxy-4-methylcoumarin (AMMC) as a specific CYP2D6 probe in human liver microsomes // *Drug Metab. Dispos.* – 2001. – V. 29. – №. 9. – P. 1196-1200.

62. Kumar S. Identification of a novel laser dye substrate of mammalian cytochromes P450: Application in rapid kinetic analysis, inhibitor screening, and directed evolution // *J. Biomol. Screening.* – 2007. – V. 12. – №. 5. – P. 677-682.

63. Takahashi R.H., Achour B., Prasad B. Quantitative determination of cytochrome P450 using LC-MS/MS // *Cytochrome P450: In Vitro methods and protocols* / edited by Yan Z., Caldwell G.W. – Humana New York, USA, 2021. – P. 55-69.

64. Lahoz A., Donato M.T., Picazo L., Gómez-Lechón M.J., Castell J.V. Determination of major human cytochrome P450s activities in 96-well plates using liquid

chromatography tandem mass spectrometry // *Toxicol. In Vitro.* – 2007. – V. 21. – №. 7. – P. 1247-1252.

65. Scheller F., Renneberg R., Strnad G., Pommerening K., Mohr P. Electrochemical aspects of cytochrome P-450 system from liver microsomes // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1977. – V. 4. – №. 4. – P. 500-507.

66. Faulkner K.M., Shet M.S., Fisher C.W., Estabrook R.W. Electrocatalytically driven omega-hydroxylation of fatty acids using cytochrome P450 4A1 // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1995. – V. 92. – №. 17. – P. 7705-7709.

67. Estabrook R.W., Faulkner K.M., Shet M.S., Fisher C.W. Application of electrochemistry for P450-catalyzed reactions // *Methods in enzymology* / edited by Johnson E.F., Waterman M.R. – Academic Press, 1996. – V. 272, Ch. 5. – P. 44-51.

68. Estabrook R.W., Shet M.S., Fisher C.W., Jenkins C.M., Waterman M.R. The interaction of NADPH-P450 reductase with P450: an electrochemical study of the role of the flavin mononucleotide-binding domain // *Archives of biochemistry and biophysics.* – 1996. – V. 333. – №. 1. – P. 308-315.

69. Yarman A., Wollenberger U., Scheller F. W. Sensors based on cytochrome P450 and CYP mimicking systems // *Electrochim. Acta.* – 2013. – V. 110. – P. 63-72.

70. Khan M.R. Immobilized enzymes: a comprehensive review // *Bulletin of the National Research Centre.* – 2021. – V. 45. – P. 1-13.

71. Valikhani D., Bolivar J.M., Pelletier J.N. An overview of cytochrome P450 immobilization strategies for drug metabolism studies, biosensing, and biocatalytic applications: challenges and opportunities // *ACS Catal.* – 2021. – V. 11. – №. 15. – P. 9418-9434.

72. Udit A.K., Hill M.G., Gray H.B. Electrochemical Activation of Cytochrome P450 // *Electrochem. Processes Biol. Syst.* – 2015. – P. 133-167.

73. Полярография и вольтамперометрия. Теоретические основы и аналитическая практика / Хенце Г., пер. с нем. Гармаша А.В., Каменева А.И. – БИНОМ. Лаборатория знаний, Москва, 2010. – 284 С.

74. Электроаналитические методы. Теория и практика / Пер. с англ., редактор Шольц Ф. – БИНОМ. Лаборатория знаний, Москва, 2006. – 326 С.

75. Brett C.M.A., Brett O. Electrochemistry: principles, methods, and applications // Oxford University Press, New York, USA, 1993. – 444 P.
76. Dutton P.L. Redox potentiometry: Determination of midpoint potentials of oxidation-reduction components of biological electron-transfer systems // Methods in enzymology / edited by Johnson E.F., Waterman M.R. – Academic Press, 1978. – V. 54, Ch. 23. – P. 411-435.
77. Bard A.J., Faulkner L.R. Electrochemical methods: fundamentals and applications / 2nd edition. – John Wiley & Sons, 2001. – 833 P.
78. Wang J. Study of electrode reactions and interfacial properties // Analytical Electrochemistry – 3rd edition. – John Wiley & Sons, 2006, – Ch. 2. – P. 29-66.
79. Bartlett P.N. Bioelectrochemistry: fundamentals, experimental techniques and applications. – John Wiley & Sons, 2008.
80. Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems // J. Electroanal. Chem. – 1979. – V. 101. – P. 19-28.
81. Krishnan S., Abeykoon A., Schenkman J.B., Rusling J.F. Control of electrochemical and ferryl-oxo formation kinetics of cytochrome P450s in polyion films by heme iron spin state and secondary structure // J. Am. Chem. Soc. – 2009. – V. 131. – №. 44. – P. 16215-16224.
82. Sucheta A., Cammack R., Weiner J., Armstrong F.A. Reversible electrochemistry of fumarate reductase immobilized on an electrode surface. Direct voltammetric observations of redox centers and their participation in rapid catalytic electron transport // Biochemistry. – 1993. – V. 32. – №. 20. – P. 5455-5465.
83. Guto P.M., Rusling J.F. Enzyme-like kinetics of ferryl-oxo myoglobin formation in films on electrodes in microemulsions // J. Phys. Chem. B. – 2005. – V. 109. – №. 51. – P. 24457-24464.
84. Krishnan S., Schenkman J.B., Rusling J.F. Bioelectronic delivery of electrons to cytochrome P450 enzymes // J. Phys. Chem. B. – 2011. – V. 115. – №. 26. – P. 8371-8380.

85. Léger C., Bertrand P. Direct electrochemistry of redox enzymes as a tool for mechanistic studies // *Chem. Rev.* – 2008. – V. 108. – №. 7. – P. 2379-2438.
86. Lim J., Hoffmann M.R. Substrate oxidation enhances the electrochemical production of hydrogen peroxide // *Chem. Eng. J.* – 2019. – V. 374. – P. 958-964.
87. Albertolle M.E., Guengerich F.P. The relationships between cytochromes P450 and H₂O₂: production, reaction, and inhibition // *J. Inorg. Biochem.* – 2018. – V. 186. – P. 228-234.
88. Quaranta M., Murkovic M., Klimant I. A new method to measure oxygen solubility in organic solvents through optical oxygen sensing // *Analyst.* – 2013. – V. 138. – №. 21. – P. 6243-6245.
89. Dvoranová D., Barbieriková Z., Brezová V. Radical intermediates in photoinduced reactions on TiO₂ (an EPR spin trapping study) // *Molecules.* – 2014. – V. 19. – №. 11. – P. 17279-17304.
90. Kostin V.A., Zolottsev V.A., Kuzikov A.V., Masamrek R. A., Shumyantseva V.V., Veselovsky A.V., Stulov S.V., Novikov R.A, Timofeev V.P., Misharin A.Y. Oxazolinyl derivatives of [17(20)E]-21-norpregnene differing in the structure of A and B rings. Facile synthesis and inhibition of CYP17A1 catalytic activity // *Steroids.* – 2016. – V. 115. – P. 114-122.
91. Honeychurch M.J. The electrochemistry of cytochrome P450. What are we actually measuring? // *J. Inorg. Biochem.* – 2003. – V. 1. – №. 96. – P. 151.
92. Fantuzzi A., Capria E., Mak, L.H., Dodhia V.R., Sadeghi S.J., Collins S., Somers G., Huq E., Gilardi G. An electrochemical microfluidic platform for human P450 drug metabolism profiling // *Anal. Chem.* – 2010. – V. 82. – №. 24. – P. 10222-10227.
93. Fantuzzi A., Mak L.H., Capria E., Dodhia V., Panicco P., Collins S., Gilardi G. A new standardized electrochemical array for drug metabolic profiling with human cytochromes P450 // *Anal. Chem.* – 2011. – V. 83. – №. 10. – P. 3831-3839.
94. Xu X., Wei W., Huang M., Yao L., Liu S. Electrochemically driven drug metabolism via cytochrome P450 2C9 isozyme microsomes with cytochrome P450 reductase and indium tin oxide nanoparticle composites // *Chem. Commun.* – 2012. – V. 48. – №. 63. – P. 7802-7804.

95. Nerimetla R., Premaratne G., Liu H., Krishnan S. Improved electrocatalytic metabolite production and drug biosensing by human liver microsomes immobilized on amine-functionalized magnetic nanoparticles // *Electrochim. Acta.* – 2018. – V. 280. – P. 101-107.
96. Fleming B.D., Bell S.G., Wong L.L., Bond A.M. The electrochemistry of a heme-containing enzyme, CYP19A2, adsorbed directly onto a pyrolytic graphite electrode // *J. Electroanal. Chem.* – 2007. – V. 611. – №. 1-2. – P. 149-154.
97. Kazlauskaitė Ju., Westlake A.C.G., Wong L.L., Hill H.A.O. Direct electrochemistry of cytochrome P450cam // *Chem. Commun.* – 1996. – №. 18. – P. 2189-2190.
98. Zhe Z., Nassar A.E.F., Lu Z., Schenkman J., Rusling J. Direct electron injection from electrodes to cytochrome P450cam in biomembrane-like films // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* – 1997. – V. 93. – №. 9. – P. 1769-1774.
99. Panicco P., Castrignanò S., Sadeghi S.J., Di Nardo G., Gilardi G. Engineered human CYP2C9 and its main polymorphic variants for bioelectrochemical measurements of catalytic response // *Bioelectrochemistry.* – 2021. – V. 138. – P. 107729.
100. Fleming B.D., Tian Y., Bell S.G., Wong L.L., Urlacher V., Hill H.A.O. Redox properties of cytochrome P450BM3 measured by direct methods // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – V. 270. – №. 20. – P. 4082-4088.
101. Johnson D.L., Lewis B.C., Elliot D.J., Miners J.O., Martin L.L. Electrochemical characterisation of the human cytochrome P450 CYP2C9 // *Biochem. Pharmacol.* – 2005. – V. 69. – №. 10. – P. 1533-1541.
102. Sligar S.G. Coupling of spin, substrate, and redox equilibria in cytochrome P450 // *Biochemistry.* – 1976. – V. 15. – №. 24. – P. 5399-5406.
103. Sligar S.G., Gunsalus I.C. A thermodynamic model of regulation: modulation of redox equilibria in camphor monooxygenase // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1976. – V. 73. – №. 4. – P. 1078-1082.
104. Light D.R., Orme-Johnson N.R. Beef adrenal cortical cytochrome P-450 which catalyzes the conversion of cholesterol to pregnenolone. Oxidation-reduction

potentials of the free, steroid-complexed, and adrenodoxin-complexed P-450 // J. Biol. Chem. – 1981. – V. 256. – №. 1. – P. 343-350.

105. Fisher M.T., Sligar S.G. Control of heme protein redox potential and reduction rate: linear free energy relation between potential and ferric spin state equilibrium // J. Am. Chem. Soc. – 1985. – V. 107. – №. 17. – P. 5018-5019.

106. Wu Y. Direct electrochemistry of cytochrome P450 6A1 in mimic bio-membrane and its application for pesticides sensing // Sens. Actuators, B. – 2011. – V. 156. – №. 2. – P. 773-778.

107. Zhang J., Huang X., Zhang L., Si Y., Guo S., Su H., Liu J. Layer-by-layer assembly for immobilizing enzymes in enzymatic biofuel cells // Sustainable. Energy. Fuels. – 2020. – V. 4. – №. 1. – P. 68-79.

108. Lvov Y. M., Lu Z., Schenkman J.B., Zu X., Rusling J.F. Direct electrochemistry of myoglobin and cytochrome P450cam in alternate layer-by-layer films with DNA and other polyions // J. Am. Chem. Soc. – 1998. – V. 120. – №. 17. – P. 4073-4080.

109. Zu X., Lu Z., Zhang Z., Schenkman J.B., Rusling J.F. Electroenzyme-catalyzed oxidation of styrene and cis- β -methylstyrene using thin films of cytochrome P450cam and myoglobin // Langmuir. – 1999. – V. 15. – №. 21. – P. 7372-7377.

110. Sadeghi S.J., Ferrero S., Di Nardo G., Gilardi G. Drug–drug interactions and cooperative effects detected in electrochemically driven human cytochrome P450 3A4 // Bioelectrochemistry. – 2012. – V. 86. – P. 87-91.

111. Riley R.J., Howbrook D. *In vitro* analysis of the activity of the major human hepatic CYP enzyme (CYP3A4) using [N-methyl- ^{14}C]-erythromycin // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. – 1997. – V. 38. – №. 4. – P. 189-193.

112. Maurice M., Pichard L., Daujat M., Fabre I., Joyeux H., Domergue J., Maurel P. Effects of imidazole derivatives on cytochromes P450 from human hepatocytes in primary culture // FASEB J. – 1992. – V. 6. – №. 2. – P. 752-758.

113. Moody G.C. Fully automated analysis of activities catalysed by the major human liver cytochrome P450 (CYP) enzymes: assessment of human CYP inhibition potential // Xenobiotica. – 1999. – V. 29. – №. 1. – P. 53-75.

114. Masubuchi Y., Ose A., Horie T. Diclofenac-induced inactivation of CYP3A4 and its stimulation by quinidine // *Drug Metab. Dispos.* – 2002. – V. 30. – №. 10. – P. 1143-1148.
115. Haehner T., Refaie M.O.I., Müller-Enoch D. Drug-drug interactions evaluated by a highly active reconstituted native human cytochrome P4503A4 and human NADPH-cytochrome P450 reductase system // *Arzneim. Forsch.* – 2004. – V. 54. – №. 01. – P. 78-83.
116. Munge B., Estavillo C., Schenkman J.B., Rusling J.F. Optimization of electrochemical and peroxide-driven oxidation of styrene with ultrathin polyion films containing cytochrome P450cam and myoglobin // *ChemBioChem.* – 2003. – V. 4. – №. 1. – P. 82-89.
117. Estavillo C., Lu Z., Jansson I., Schenkman J.B., Rusling J.F. Epoxidation of styrene by human cyt P450 1A2 by thin film electrolysis and peroxide activation compared to solution reactions // *Biophys. Chem.* – 2003. – V. 104. – №. 1. – P. 291-296.
118. Sun P., Wu Y. An amperometric biosensor based on human cytochrome P450 2C9 in polyacrylamide hydrogel films for bisphenol A determination // *Sens. Actuators B.* – 2013. – V. 178. – P. 113-118.
119. Silveira C.M., Rodrigues P.R., Ghach W., Pereira S.A., Esteves F., Kranendonk M., Etienne M., Almeida M.G. Electrochemical activity of cytochrome P450 1A2: the relevance of O₂ control and the natural electron donor // *ChemElectroChem.* – 2021. – V. 8. – №. 3. – P. 500-507.
120. Fantuzzi A., Fairhead M., Gilardi G. Direct electrochemistry of immobilized human cytochrome P450 2E1 // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – V. 126. – №. 16. – P. 5040-5041.
121. Yang M., Kabulski J.L., Wollenberg L., Chen X., Subramanian M., Tracy T.S., Lederman D., Gannett P.M., Wu N. Electrocatalytic drug metabolism by CYP2C9 bonded to a self-assembled monolayer-modified electrode // *Drug Metab. Dispos.* – 2009. – V. 37. – №. 4. – P. 892-899.

122. Fantuzzi A., Capria E., Mak L.H., Dodhia V.R., Sadeghi S.J., Collins S., Somers G., Huq E., Gilardi G. An electrochemical microfluidic platform for human P450 drug metabolism profiling // *Anal. Chem.* – 2010. – V. 82. – №. 24. – P. 10222-10227.
123. Ngui J.S., Tang W., Stearns R.A., Shou M., Miller R.R., Zhang Y., Lin J.H., Baillie T.A. Cytochrome P450 3A4-mediated interaction of diclofenac and quinidine // *Drug Metab. Dispos.* – 2000. – V. 28. – №. 9. – P. 1043-1050.
124. Niwa T. Shiraga T., Yamasaki S., Ishibashi K., Ohno Y., Kagayama A. *In vitro* activation of 7-benzyloxyresorufin O-debenzylation and nifedipine oxidation in human liver microsomes // *Xenobiotica.* – 2003. – V. 33. – №. 7. – P. 717-729.
125. Somers G.I., Harris A.J., Bayliss M.K., Houston J.B. The metabolism of the 5HT₃ antagonists ondansetron, alosetron and GR87442 I: a comparison of *in vitro* and *in vivo* metabolism and *in vitro* enzyme kinetics in rat, dog and human hepatocytes, microsomes and recombinant human enzymes // *Xenobiotica.* – 2007. – V. 37. – №. 8. – P. 832-854.
126. Evert B., Eichelbaum M., Haubruck H., Zanger U.M. Functional properties of CYP2D6 1 (wild-type) and CYP2D6 7 (His324Pro) expressed by recombinant baculovirus in insect cells // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* – 1997. – V. 355. – P. 309-318.
127. Bapiro T.E., Hasler J.A., Ridderström M., Masimirembwa C.M. The molecular and enzyme kinetic basis for the diminished activity of the cytochrome P450 2D6. 17 (CYP2D6. 17) variant: potential implications for CYP2D6 phenotyping studies and the clinical use of CYP2D6 substrate drugs in some African populations // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – V. 64. – №. 9. – P. 1387-1398.
128. Guengerich F.P., Miller G.P., Hanna I.H., Martin M.V., Léger S., Black C., Chauret N, Silva J.M., Trimble L.A., Yergey J.A., Nicoll-Griffith D.A. Diversity in the oxidation of substrates by cytochrome P450 2D6: lack of an obligatory role of aspartate 301– substrate electrostatic bonding // *Biochemistry.* – 2002. – V. 41. – №. 36. – P. 11025-11034.
129. Marcucci K.A., Pearce R.E., Crespi C., Steimel D.T., Leeder J.S., Gaedigk A. Characterization of cytochrome P450 2D6. 1 (CYP2D6. 1), CYP2D6. 2, and CYP2D6.

17 activities toward model CYP2D6 substrates dextromethorphan, bufuralol, and debrisoquine // *Drug Metab. Dispos.* – 2002. – V. 30. – №. 5. – P. 595-601.

130. Shen H., He M.M., Liu H., Wrighton S.A., Wang L., Guo B., Li C. Comparative metabolic capabilities and inhibitory profiles of CYP2D6.1, CYP2D6.10, and CYP2D6.17 // *Drug Metab. Dispos.* – 2007. – V. 35. – №. 8. – P. 1292-1300.

131. Sakuyama K., Sasaki T., Ujiie S., Obata K., Mizugaki M., Ishikawa M., Hiratsuka M. Functional characterization of 17 CYP2D6 allelic variants (CYP2D6.2, 10, 14A–B, 18, 27, 36, 39, 47–51, 53–55, and 57) // *Drug Metab. Dispos.* – 2008. – V. 36. – №. 12. – P. 2460-2467.

132. Mak L.H., Sadeghi S.J., Fantuzzi A., Gilardi G. Control of human cytochrome P450 2E1 electrocatalytic response as a result of unique orientation on gold electrodes // *Anal. Chem.* – 2010. – V. 82. – №. 12. – P. 5357-5362.

133. Ray M., Mhaske S.D., Haram S.K., Mazumdar S. Covalent conjugation of single-walled carbon nanotube with CYP101 mutant for direct electrocatalysis // *Anal. Biochem.* – 2021. – V. 626. – P. 114204.

134. Peng L., Yang X., Zhang Q., Liu S. Electrochemistry of cytochrome P450 2B6 on electrodes modified with zirconium dioxide nanoparticles and platinum components // *Electroanalysis.* – 2008. – V. 20. – №. 7. – P. 803-807.

135. Liu S., Peng L., Yang X., Wu Y., He L. Electrochemistry of cytochrome P450 enzyme on nanoparticle-containing membrane-coated electrode and its applications for drug sensing // *Anal. Biochem.* – 2008. – V. 375. – №. 2. – P. 209-216.

136. Xu X., Zheng Q., Bai G., Dai Q., Cao X., Yao Y., Liu S., Yao C. Polydopamine functionalized nanoporous graphene foam as nanoreactor for efficient electrode-driven metabolism of steroid hormones // *Biosens. Bioelectron.* – 2018. – V. 119. – P. 182-190.

137. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Bachmann T.T., Bilitewski U., Schmid R.D., Archakov A.I. Electrochemical reduction of flavocytochromes 2B4 and 1A2 and their catalytic activity // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – V. 377. – №. 1. – P. 43-48.

138. Dodhia V.R., Sassone C., Fantuzzi A., Di Nardo G., Sadeghi S.J., Gilardi G. Modulating the coupling efficiency of human cytochrome P450 CYP3A4 at electrode

surfaces through protein engineering // *Electrochem. Commun.* – 2008. – V. 10. – №. 11. – P. 1744-1747.

139. Zanger U.M., Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation // *Pharmacol. Ther.* – 2013. – V. 138. – №. 1. – P. 103-141.

140. Walgama C., Nerimetla R., Materer N.F., Schildkraut D., Elman J.F., Krishnan S. A simple construction of electrochemical liver microsomal bioreactor for rapid drug metabolism and inhibition assays // *Anal. Chem.* – 2015. – V. 87. – №. 9. – P. 4712-4718.

141. Walker A., Walgama C., Nerimetla R., Alavi S.H., Echeverria E., Harimkar S.P., McIlroy D.N., Krishnan S. Roughened graphite biointerfaced with P450 liver microsomes: surface and electrochemical characterizations // *Colloids. Surf. B.* – 2020. – V. 189. – P. 110790.

142. Mie Y., Suzuki M., Komatsu Y. Electrochemically driven drug metabolism by membranes containing human cytochrome P450 // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – V. 131. – №. 19. – P. 6646-6647.

143. Iwata H., Fujita K.I., Kushida H., Suzuki A., Konno Y., Nakamura K., Fujino A., Kamataki T. High catalytic activity of human cytochrome P450 co-expressed with human NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* // *Biochem. Pharmacol.* – 1998. – V. 55. – №. 8. – P. 1315-1325. .

144. Sullivan-Klose T.H., Ghanayem B.I., Bell D.A., Zhang Z.Y., Kaminsky L.S., Shenfield G.M., Miners J.O.; Birkett D.J., Goldstein J.A. The role of the CYP2C9-Leu 359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism // *Pharmacogenet. Genomics.* – 1996. – V. 6. – №. 4. – P. 341-349.

145. Takanashi K., Tainaka H., Kobayashi K., Yasumori T., Hosakawa M., Chiba K. CYP2C9 Ile359 and Leu359 variants: enzyme kinetic study with seven substrates // *Pharmacogenet. Genomics.* – 2000. – V. 10. – №. 2. – P. 95-104.

146. Hanatani T., Fukuda T., Onishi S., Funae Y., Azuma J. No major difference in inhibitory susceptibility between CYP2C9.1 and CYP2C9.3 // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2003. – V. 59. – P. 233-235.

147. Guo Y., Wang Y., Si D., Fawcett P.J., Zhong D., Zhou H. Catalytic activities of human cytochrome P450 2C9*1, 2C9*3 and 2C9*13 // *Xenobiotica*. – 2005. – V. 35. – №. 9. – P. 853-861.
148. Nerimetla R., Walgama C., Singh V., Hartson S.D., Krishnan S. Mechanistic insights into voltage-driven biocatalysis of a cytochrome P450 bactosomal film on a self-assembled monolayer // *ACS Catal.* – 2017. – V. 7. – №. 5. – P. 3446-3453.
149. Joseph S., Rusling J.F., Lvov Y.M., Friedberg T., Fuhr U. An amperometric biosensor with human CYP3A4 as a novel drug screening tool // *Biochem. Pharmacol.* – 2003. – V. 65. – №. 11. – P. 1817-1826.
150. Sultana N., Schenkman J.B., Rusling J.F. Protein film electrochemistry of microsomes genetically enriched in human cytochrome P450 monooxygenases // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – V. 127. – №. 39. – P. 13460-13461.
151. Wasalathanthri D.P., Mani V., Tang C.K., Rusling J.F. Microfluidic electrochemical array for detection of reactive metabolites formed by cytochrome P450 enzymes // *Anal. Chem.* – 2011. – V. 83. – №. 24. – P. 9499-9506.
152. Hecht S. S., Hoffmann D. Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke // *Carcinogenesis*. – 1988. – V. 9. – №. 6. – P. 875-884.
153. Wang M., Hecht S.S. A cyclic N⁷, C-8 guanine adduct of N-nitrosopyrrolidine (NPYR): formation in nucleic acids and excretion in the urine of NPYR-treated rats // *Chem. Res. Toxicol.* – 1997. – V. 10. – №. 7. – P. 772-778.
154. Hecht S.S. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines // *Chem. Res. Toxicol.* – 1998. – V. 11. – №. 6. – P. 559-603.
155. Hvastkovs E.G., So M., Krishnan S., Bajrami B., Tarun M., Jansson I., Schenkman J.B., Rusling J.F. Electrochemiluminescent arrays for cytochrome P450-activated genotoxicity screening. DNA damage from benzo [a] pyrene metabolites // *Anal. Chem.* – 2007. – V. 79. – №. 5. – P. 1897-1906.
156. Zhao L., Schenkman J.B., Rusling J.F. High-throughput metabolic toxicity screening using magnetic biocolloid reactors and LC– MS/MS // *Anal. Chemistry*. – 2010. – V. 82. – №. 24. – P. 10172-10178.

157. Yuan R., Madani S., Wei X.X., Reynolds K., Huang S.M. Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study *in vitro* drug interactions // Drug Metab. Dispos. – 2002. – V. 30. – №. 12. – P. 1311-1319.
158. Pelkonen O., Turpeinen M., Hakkola J., Honkakoski P., Hukkanen J., Raunio, H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status // Arch. Toxicol. – 2008. – V. 82. – P. 667-715.
159. Dierks E.A., Stams K.R., Lim H.K., Cornelius G., Zhang H., Ball S.E. A method for the simultaneous evaluation of the activities of seven major human drug-metabolizing cytochrome P450s using an *in vitro* cocktail of probe substrates and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry // Drug Metab. Dispos. – 2001. – V. 29. – №. 1. – P. 23-29.
160. Xu X., Bai G., Song L., Zheng Q., Yao Y., Liu S., Yao C. Fast steroid hormone metabolism assays with electrochemical liver microsomal bioreactor based on polydopamine encapsulated gold-graphene nanocomposite // Electrochim. Acta. – 2017. – V. 258. – P. 1365-1374.
161. Huang M., Xu X., Yang H., Liu S. Electrochemically-driven and dynamic enhancement of drug metabolism via cytochrome P450 microsomes on colloidal gold/graphene nanocomposites // RSC Adv. – 2012. – V. 2. – №. 33. – P. 12844-12850.
162. Jiang J., Wang J., Cai H., Li K., Deng Y. CYP3As catalyze nifedipine oxidation in pig liver microsomes: enzyme kinetics, inhibition and functional expression // Catal. Commun. – 2011. – V. 12. – №. 8. – P. 694-697.
163. Baj-Rossi C., Jost T.R., Cavallini A., Grassi F., De Micheli G., Carrara S. Continuous monitoring of Naproxen by a cytochrome P450-based electrochemical sensor // Biosens. Bioelectron. – 2014. – V. 53. – P. 283-287.
164. Baj-Rossi C., Müller C., von Mandach U., De Micheli G., Carrara S. Faradic peaks enhanced by carbon nanotubes in microsomal cytochrome P450 electrodes // Electroanalysis. – 2015. – V. 27. – №. 6. – P. 1507-1515.

165. Eswaramoorthy S., Bonanno J.B., Burley S. K., Swaminathan S. Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2006. – V. 103. – №. 26. – P. 9832-9837.
166. Başaran R., Benay C.A.N. Flavin containing monooxygenases and metabolism of xenobiotics // *Turk. J. Pharm. Sci.* – 2017. – V. 14. – №. 1. – P. 90.
167. Huang S., Howington M.B., Dobry C.J., Evans C.R., Leiser S.F. Flavin-containing monooxygenases are conserved regulators of stress resistance and metabolism // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2021. – V. 9. – P. 630188.
168. Ikegami M., Mie Y., Hirano Y., Komatsu Y. Direct electrochemistry of microsomal human flavin-containing monooxygenases 1 and 3 on naphthalenethiol thin films // *ECS Electrochem. Lett.* – 2013. – V. 2. – №. 12. – P. G5- G7.
169. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Suprun E.V., Chalenko Y.M., Vagin Yu.M., Rudakov Y.O., Shatskaya M.A., Archakov A.I. Electrochemical investigations of cytochrome P450 // *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics.* – 2011. – V. 1814. – №. 1. – P. 94-101.
170. Khushvakov J., Nussbaum R., Cadoux C., Duan J., Stripp S.T., Milton R.D. Following electroenzymatic hydrogen production by rotating ring–disk electrochemistry and mass spectrometry // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2021. – V. 60. – №. 18. – P. 10001-10006.
171. Chen Z.P., Jiang J.H., Zhang X.B., Shen G.L., Yu R.Q. An electrochemical amplification immunoassay using bi-electrode signal transduction system // *Talanta.* – 2007. – V. 71. – №. 5. – P. 2029-2033.
172. Ramašauskas L., Meškys R., Ratautas D. Real-time glucose monitoring system containing enzymatic sensor and enzymatic reference electrodes // *Biosens. Bioelectron.* – 2020. – V. 164. – P. 112338.
173. Chansaenpak K., Kamkaew A., Lisnund S., Prachai P., Ratwirunkit P., Jingpho T., Blay V., Pinyou P. Development of a sensitive self-powered glucose biosensor based on an enzymatic biofuel cell // *Biosensors.* – 2021. – V. 11. – №. 1. – P. 16.

174. Jurva U., Wikström H.V., Weidolf L., Bruins A.P. Comparison between electrochemistry/mass spectrometry and cytochrome P450 catalyzed oxidation reactions // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2003. – V. 17. – №. 8. – P. 800-810.
175. Nouri-Nigjeh E., Bischoff R., P. Bruins A., P. Permentier H. Electrochemistry in the mimicry of oxidative drug metabolism by cytochrome P450s // *Curr. Drug Metab.* – 2011. – V. 12. – №. 4. – P. 359-371.
176. Yoshihiko F., Wataru K., Toshio C., Toshiro N., Toyoko H. CYP2D in the Brain // *Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2003. – V. 18. – №. 6. – P. 337-349.
177. Protti M., Mandrioli R., Marasca C., Cavalli A., Serretti A., Mercolini L. New-generation, non-SSRI antidepressants: Drug-drug interactions and therapeutic drug monitoring. Part 2: NaSSAs, NRIs, SNDRI, MASSAs, NDRI, and others // *Med. Res. Rev.* – 2020. – V. 40. – №. 5. – P. 1794-1832.
178. Suckow R.F., Cooper T.B., Quitkin F.M., Stewart J.W. Determination of mianserin and metabolites in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection // *J. Pharm. Sci.* – 1982. – V. 71. – №. 8. – P. 889-892.
179. Nguyen H.Q., Callegari E., Obach R.S. The use of *in vitro* data and physiologically-based pharmacokinetic modeling to predict drug metabolite exposure: desipramine exposure in cytochrome P4502D6 extensive and poor metabolizers following administration of imipramine // *Drug Metab. Dispos.* – 2016. – V. 44. – №. 10. – P. 1569-1578.
180. Koyama E., Kikuchi Y., Echizen H., Chiba K., Ishizaki T. Simultaneous high-performance liquid chromatography-electrochemical detection determination of imipramine, desipramine, their 2-hydroxylated metabolites, and imipramine N-oxide in human plasma and urine: preliminary application to oxidation pharmacogenetics // *Ther. Drug Monit.* – 1993. – V. 15. – №. 3. – P. 224-235.
181. Bogni A., Monshouwer M., Moscone A., Hidestrand M., Ingelman-Sundberg M., Hartung T., Coecke S. Substrate specific metabolism by polymorphic cytochrome P450 2D6 alleles // *Toxicol. In Vitro.* – 2005. – V. 19. – №. 5. – P. 621-629.

182. DeVane C.L. Antidepressant–drug interactions are potentially but rarely clinically significant // *Neuropsychopharmacology*. – 2006. – V. 31. – №. 8. – P. 1594-1604.
183. Tang W. The metabolism of diclofenac-enzymology and toxicology perspectives // *Curr. Drug Metab.* – 2003. – V. 4. – №. 4. – P. 319-329.
184. Goyal R. N., Chatterjee S., Agrawal B. Electrochemical investigations of diclofenac at edge plane pyrolytic graphite electrode and its determination in human urine // *Sens. Actuators, B*. – 2010. – V. 145. – №. 2. – P. 743-748.
185. Cid-Cerón M.M., Guzmán-Hernández D.S., Ramírez-Silva M.T., Galano A., Romero-Romo M., Palomar-Pardavé M. New insights on the kinetics and mechanism of the electrochemical oxidation of diclofenac in neutral aqueous medium // *Electrochim. Acta*. – 2016. – V. 199. – P. 92-98.
186. Aguilar-Lira G.Y., Álvarez-Romero G.A., Zamora-Suárez A., Palomar-Pardavé M., Rojas-Hernández A., Rodríguez-Ávila J.A., Páez-Hernández M.E. New insights on diclofenac electrochemistry using graphite as working electrode // *J. Electroanal. Chem.* – 2017. – V. 794. – P. 182-188.
187. Madsen K.G., Skonberg C., Jurva U., Cornett C., Hansen S.H., Johansen T.N., Olsen J. Bioactivation of diclofenac *in vitro* and *in vivo*: correlation to electrochemical studies // *Chem. Res. Toxicol.* – 2008. – V. 21. – №. 5. – P. 1107-1119.
188. Zi J., Liu D., Ma P., Huang H., Zhu J., Wei D., Yang J., Chen C. Effects of CYP2C9* 3 and CYP2C9* 13 on diclofenac metabolism and inhibition-based drug-drug interactions // *Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2010. – V. 25. – №. 4. – P. 343-350.
189. Sodhi J.K., Halladay J.S. Case study 9: Probe-dependent binding explains lack of CYP2C9 inactivation by 1-aminobenzotriazole (ABT) // *Enzyme kinetics in drug metabolism: fundamentals and applications* / edited by Nagar S., Argikar U.A., Tweedie D.J. – Springer International Publishing, Switzerland, 2014. – P. 765-779.
190. Klammers F., Goetschi A., Ekiciler A., Walter I., Parrott N., Fowler S., Umehara K. Estimation of fraction metabolized by cytochrome P450 enzymes using long-term cocultured human hepatocytes // *Drug Metab. Dispos.* – 2022. – V. 50. – №. 5. – P. 566-575.

191. Kohl C., Steinkellner M. Prediction of pharmacokinetic drug/drug interactions from *in vitro* data: interactions of the nonsteroidal anti-inflammatory drug lornoxicam with oral anticoagulants // Drug Metab. Dispos. – 2000. – V. 28. – №. 2. – P. 161-168.
192. Tracy T.S., Hutzler J.M., Haining R.L., Rettie A.E., Hummel M.A., Dickmann L.J. Polymorphic variants (CYP2C9*3 and CYP2C9*5) and the F114L active site mutation of CYP2C9: effect on atypical kinetic metabolism profiles // Drug Metab. Dispos. – 2002. – V. 30. – №. 4. – P. 385-390.
193. Suwa T., Urano H., Shinohara Y., Kokatsu J. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of lornoxicam and its 5'-hydroxy metabolite in human plasma using electrochemical detection // J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. – 1993. – V. 617. – №. 1. – P. 105-110.
194. Beloti L.G.M., Miranda L.F.C., Queiroz M.E.C. Butyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate monolith for online in-tube SPME-UHPLC-MS/MS to determine chlorpromazine, clozapine, quetiapine, olanzapine, and their metabolites in plasma samples // Molecules. – 2019. – V. 24. – №. 2. – P. 310.
195. McCreery R.L. Oxidative reactions of hydroxylated chlorpromazine metabolites // J. Pharm. Sci. – 1977. – V. 66. – №. 3. – P. 357-361.
196. Neptune M., McCreery R.L. Chemical and electrochemical oxidation of 7-hydroxychlorpromazine // J. Med. Chem. – 1978. – V. 21. – №. 4. – P. 362-368.
197. Upthagrove A.L., Nelson W.L. Importance of amine pK_a and distribution coefficient in the metabolism of fluorinated propranolol derivatives. Preparation, identification of metabolite regioisomers, and metabolism by CYP2D6 // Drug Metab. Dispos. – 2001. – V. 29. – №. 11. – P. 1377-1388.
198. Baranowska I., Koper M. Electrochemical behavior of propranolol and its major metabolites, 4'-hydroxypropranolol and 4'-hydroxypropranolol sulfate, on glassy carbon electrode // J. Braz. Chem. Soc. – 2011. – V. 22. – P. 1601-1609.
199. Santos S.X., Cavaleiro É.T.G., Brett C.M.A. Analytical potentialities of carbon nanotube/silicone rubber composite electrodes: determination of propranolol // Electroanalysis. – 2010. – V. 22. – №. 23. – P. 2776-2783.

200. dos Santos S.X., Gomes Cavaleiro E.T. The potentialities of using a graphite-silicone rubber composite electrode in the determination of propranolol // *Anal. Lett.* – 2011. – V. 44. – №. 5. – P. 850-862.
201. Stoian I.A., Iacob B.C., Ramalho J.P.P., Marian I.O., Chiş V., Bodoki E., Oprean R. A chiral electrochemical system based on l-cysteine modified gold nanoparticles for propranolol enantiodiscrimination: electroanalysis and computational modelling // *Electrochim. Acta.* – 2019. – V. 326. – P. 134961.
202. Taxak N., Prasad K.C., Bharatam P.V. Mechanistic insights into the bioactivation of phenacetin to reactive metabolites: a DFT study // *Comput. Theor. Chem.* – 2013. – V. 1007. – P. 48-56.
203. Yin H., Meng X., Xu Z., Chen L., Ai S. Electrochemical behavior of phenacetin on CdSe microspheres modified glassy carbon electrode and its simultaneous determination with paracetamol and 4-aminophenol // *Anal. Methods.* – 2012. – V. 4. – №. 5. – P. 1445-1451.
204. Smith H. S. Opioid metabolism // *Mayo Clin. Proc.* – 2009. – V. 84. – №. 7. – P. 613-624.
205. Shord S.S., Cavallari L.H., Gao W., Jeong H.Y., Deyo K., Patel S.R., Camp J.R., Labott S.M., Molokie R.E. The pharmacokinetics of codeine and its metabolites in Blacks with sickle cell disease // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2009. – V. 65. – P. 651-658.
206. Wester N., Mynttinen E., Etula J., Lilius T., Kalso E., Kauppinen E.I., Laurila T., Koskinen J. Simultaneous detection of morphine and codeine in the presence of ascorbic acid and uric acid and in human plasma at nafion single-walled carbon nanotube thin-film electrode // *ACS Omega.* – 2019. – V. 4. – №. 18. – P. 17726-17734.
207. Jimenez T.E.P., Mealey K.L., Grubb T.L., Greene S.A. Tramadol metabolism to O-desmethyl tramadol (M1) and N-desmethyl tramadol (M2) by dog liver microsomes: species comparison and identification of responsible canine cytochrome P-450s (CYPs) // *Drug Metab. Dispos.* – 2016. – V. 44. – №. 12. – P. 1963-1972.
208. Mynttinen E., Wester N., Lilius T., Kalso E., Koskinen J., Laurila T. Simultaneous electrochemical detection of tramadol and O-desmethyltramadol with

Nafion-coated tetrahedral amorphous carbon electrode // *Electrochim. Acta.* – 2019. – V. 295. – P. 347-353.

209. Lotfy H.M., Monir H.H., El-Aleem A.B.D., El-Azizel-Bayoumi A.B.D. Novel spectrophotometric methods for the determination of fluconazole in the presence of its oxidative degradation product // *J. Chil. Chem. Soc.* – 2012. – V. 57. – №. 4. – P. 1447-1455.

210. Pechurskaya T.A., Harnastai I.N., Grabovec I.P., Gilep A.A., Usanov S.A. Adrenodoxin supports reactions catalyzed by microsomal steroidogenic cytochrome P450s // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – V. 353. – №. 3. – P. 598-604.

211. Haidukevich I.V., Sushko T.A., Tumilovich A.M., Grabovec I.P., Usanov S.A., Gilep A.A. Different inhibitory effects of azole-containing drugs and pesticides on CYP2C9 polymorphic forms: an *in vitro* study // *Toxicol. In Vitro.* – 2018. – V. 50. – P. 249-256.

212. Svirid A.V., Ershov P.V., Yablokov E.O., Kaluzhskiy L.A., Florinskaya A.V., Sushko T.A., Strushkevich N.V., Gilep A.A., Usanov S.A., Medvedev A.E., Ivanov A.S. Direct molecular fishing of new protein partners for human thromboxane synthase // *Acta Naturae.* – 2017. – V. 9. – №. 4. – P. 92-100.

213. Gilep A.A., Guryev O.L., Usanov S.A., Estabrook R.W. Apo-cytochrome *b*₅ as an indicator of changes in heme accessibility: preliminary studies with cytochrome P450 3A4 // *J. Inorg. Biochem.* – 2001. – V. 87. – №. 4. – P. 237-244.

214. Ershov P.V., Yablokov E.O., Florinskaya A.V., Mezentssev Y.V., Kaluzhskiy L.A., Tumilovich A. M., Gilep A.A., Usanov S.A., Ivanov A.S. SPR—Based study of affinity of cytochrome P450s/redox partners interactions modulated by steroidal substrates // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2019. – V. 187. – P. 124-129.

215. Holmans P.L., Shet M.S., Martinwixtrom C.A., Fisher C.W., Estabrook R.W. The high-level expression in *Escherichia coli* of the membrane-bound form of human and rat cytochrome *b*₅ and studies on their mechanism of function // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1994. – V. 312. – №. 2. – P. 554-565.

216. Bonina T.A., Gilep A.A., Estabrook R.W., Usanov S.A. Engineering of proteolytically stable NADPH-cytochrome P450 reductase // *Biochemistry (Moscow)*. – 2005. – V. 70. – P. 357-365.
217. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature // *J. Biol. Chem.* – 1964. – V. 239. – №. 7. – P. 2370-2378.
218. Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems // *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* – 1979. – V. 101. – №. 1. – P. 19-28.
219. Lin X., Li Y. A sensitive determination of estrogens with a Pt nano-clusters/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode // *Biosens. Bioelectron.* – 2006. – V. 22. – №. 2. – P. 253-259.
220. Zhu Y., Liu X., Jia J. Electrochemical detection of natural estrogens using a graphene/ordered mesoporous carbon modified carbon paste electrode // *Anal. Methods*. – 2015. – V. 7. – №. 20. – P. 8626-8631.
221. Moraes F.C., Rossi B., Donatoni M.C., de Oliveira K.T., Pereira E.C. Sensitive determination of 17 β -estradiol in river water using a graphene based electrochemical sensor // *Anal. Chim. Acta.* – 2015. – V. 881. – P. 37-43.
222. Sohl C.D., Guengerich F.P. Kinetic analysis of the three-step steroid aromatase reaction of human cytochrome P450 19A1 // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – №. 23. – P. 17734-17743.
223. Hamadeh I.S., Patel J.N., Rusin S., Tan A.R. Personalizing aromatase inhibitor therapy in patients with breast cancer // *Cancer Treat. Rev.* – 2018. – V. 70. – P. 47-55.
224. Denver N., Khan S., Stasinopoulos I., Church C., Homer N.Z., MacLean M.R., Andrew R. Derivatization enhances analysis of estrogens and their bioactive metabolites in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta.* – 2019. – V. 1054. – P. 84-94.

225. Di Nardo G., Castrignanò S., Sadeghi S.J., Baravalle R., Gilardi G. Bioelectrochemistry as a tool for the study of aromatization of steroids by human aromatase // *Electrochem. Commun.* – 2015. – V. 52. – P. 25-28.
226. Ngundi M.M., Sadik O.A., Yamaguchi T., Suye S.I. First comparative reaction mechanisms of β -estradiol and selected environmental hormones in a redox environment // *Electrochem. Commun.* – 2003. – V. 5. – №. 1. – P. 61-67. (2003).
227. Hu S., Wu K., Yi H., Cui D. Voltammetric behavior and determination of estrogens at Nafion-modified glassy carbon electrode in the presence of cetyltrimethylammonium bromide // *Anal. Chim. Acta.* – 2002. – V. 464. – №. 2. – P. 209-216.
228. Akhtar M., Njar V.C.O., Wright J.N. Mechanistic studies on aromatase and related C-C bond cleaving P-450 enzymes // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 1993. – V. 44. – №. 4-6. – P. 375-387.
229. Ji J.Z., Lao K.J., Hu J., Pang T., Jiang Z.Z., Yuan H.L., Miao J.S., Chen X., Ning S.S., Xiang H., Guo Y.M., Yan M., Zhang L.Y. Discovery of novel aromatase inhibitors using a homogeneous time-resolved fluorescence assay // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2014. – V. 35. – №. 8. – P. 1082-1092.
230. Lombardi P. Exemestane, a new steroidal aromatase inhibitor of clinical relevance // *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* – 2002. – V. 1587. – №. 2-3. – P. 326-337.
231. Tipton K.F., Boyce S., O'Sullivan J., Davey, G.P., Healy J. Monoamine oxidases: certainties and uncertainties // *Curr. Med. Chem.* – 2004. – V. 11. – №. 15. – P. 1965-1982.
232. Mohutsky M., Hall S.D. Irreversible enzyme inhibition kinetics and drug–drug interactions // *Enzyme kinetics in drug metabolism: fundamentals and applications* / edited by Nagar S., Argikar U.A., Tweedie D.J. – Springer International Publishing, Switzerland, 2014. – P. 57-91.
233. Zhang Z.Y., Wong Y.N. Enzyme kinetics for clinically relevant CYP inhibition // *Curr. Drug Metab.* – 2005. – V. 6. – №. 3. – P. 241-257.

234. Ghanbari F., Rowland-Yeo K., Bloomer J.C., Clarke S.E., Lennard M.S., Tucker G.T., Rostami-Hodjegan A. A critical evaluation of the experimental design of studies of mechanism based enzyme inhibition, with implications for *in vitro* - *in vivo* extrapolation // Curr. Drug Metab. – 2006. – V. 7. – №. 3. – P. 315-334.
235. Di Salle E., Giudici D., Briatico G., Ornati G. Novel irreversible aromatase inhibitors // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1990. – V. 595. – №. 1. – P. 357-367.
236. Kocael A., Eronat A.P., Tüzüner M.B., Ekmekçi A., Orhan A.L., İkizceli İ., Yılmaz-Aydoğan H., Öztürk O. Interpretation of the effect of CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2 variants on warfarin dosing adjustment in Turkey // Mol. Biol. Rep. – 2019. – V. 46. – №. 2. – P. 1825-1833.
237. Kaminsky L.S., Zhang Z.Y. Human P450 metabolism of warfarin // Pharmacol. Ther. – 1997. – V. 73. – №. 1. – P. 67-74.
238. Silverman R.B., Holladay M.W. Drug metabolism // The organic chemistry of drug design and drug action. – 3rd edition. – Academic Press. 2014, – P. 357-422.
239. Samardžija M., Topić E., Štefanović M., Zibar L., Samardžija G., Balen S., Včev A., Domanović D., Mirat J., Barbić J. Association of CYP2C9 gene polymorphism with bleeding as a complication of warfarin therapy // Coll. Antropol. – 2008. – V. 32. – №. 2. – P. 557-564.
240. Liedtke M.D., Rathbun R.C. Drug interactions with antiretrovirals and warfarin // Expert Opin. Drug Saf. – 2010. – V. 9. – №. 2. – P. 215-223.
241. Gholivand M.B., Torkashvand M., Yavari E. Electrooxidation behavior of warfarin in Fe₃O₄ nanoparticles modified carbon paste electrode and its determination in real samples // Mater. Sci. Eng., C. – 2015. – V. 48. – P. 235-242.
242. Gholivand M. B., Mohammadi-Behzad L. An electrochemical sensor for warfarin determination based on covalent immobilization of quantum dots onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes and chitosan composite film modified electrode // Mater. Sci. Eng., C. – 2015. – V. 57. – P. 77-87.
243. Taei M., Abedi F. New modified multiwalled carbon nanotubes paste electrode for electrocatalytic oxidation and determination of warfarin in biological and pharmaceutical samples // Chin. J. Catal. – 2016. – V. 37. – №. 3. – P. 436-445.

244. Molaakbari E., Mostafavi A., Beitollahi H., Tohidiyan Z. Synthesis of conductive polymeric ionic liquid/Ni nanocomposite and its application to construct a nanostructure based electrochemical sensor for determination of warfarin in the presence of tramadol // *Talanta*. – 2017. – V. 171. – P. 25-31.
245. de Jesus Guedes T., Antônio Reis Andrade G., Barbosa Lima A., Amorim Bezerra da Silva R., Torres Pio dos Santos W. Simple and fast determination of warfarin in pharmaceutical samples using boron-doped diamond electrode in BIA and FIA systems with multiple pulse amperometric detection // *Electroanalysis*. – 2017. – V. 29. – №. 10. – P. 2340-2347.
246. Yawari I., Kaykhaili M. Determination of (S)-warfarin using an activated screen printed gold electrode modified with gold nanoparticles and an enantioselective molecularly imprinted polymer // *Anal. Methods*. – 2017. – V. 9. – №. 46. – P. 6583-6589.
247. Gholivand M.B., Solgi M. Simultaneous electrochemical sensing of warfarin and maycophenolic acid in biological samples // *Anal. Chim. Acta*. – 2018. – V. 1034. – P. 46-55.
248. Zilberg R.A., Maistrenko V.N., Zagitova L.R., Guskov V.Y., Dubrovsky D.I. Chiral voltammetric sensor for warfarin enantiomers based on carbon black paste electrode modified by 3, 4, 9, 10-perylenetetracarboxylic acid // *J. Electroanal. Chem.* – 2020. – V. 861. – P. 113986.
249. Nowak P., Olechowska P., Mitoraj M., Woźniakiewicz M., Kościelniak P. Determination of acid dissociation constants of warfarin and hydroxywarfarins by capillary electrophoresis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2015. – V. 112. – P. 89-97.
250. Naidong W., Ring P.R., Midtlien C., Jiang X. Development and validation of a sensitive and robust LC–tandem MS method for the analysis of warfarin enantiomers in human plasma // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2001. – V. 25. – №. 2. – P. 219-226.
251. Hu X.R., He J.B., Wang Y., Zhu Y.W., Tian J.J. Oxidative spectroelectrochemistry of two representative coumarins // *Electrochim. Acta*. – 2011. – V. 56. – №. 7. – P. 2919-2925.

252. Brito R.E., Capote F.P., Escobar C.L., Montoya M.R., Mellado J.R. Electrochemical oxidation pathways of hydroxycoumarins on carbon electrodes examined by LSCV and LC–MS/MS // *J. Electrochem. Soc.* – 2019. – V. 166. – №. 8. – P. H331.
253. Mosher C.M., Hummel M.A., Tracy T.S., Rettie A.E. Functional analysis of phenylalanine residues in the active site of cytochrome P450 2C9 // *Biochemistry.* – 2008. – V. 47. – №. 45. – P. 11725-11734.
254. Yamazaki H., Inoue K., Chiba K., Ozawa N., Kawai T., Suzuki Y., Goldstein J.A., Guengerich F.P., Shimada T. Comparative studies on the catalytic roles of cytochrome P450 2C9 and its Cys-and Leu-variants in the oxidation of warfarin, flurbiprofen, and diclofenac by human liver microsomes // *Biochem. Pharmacol.* – 1998. – V. 56. – №. 2. – P. 243-251.
255. Tatsumi A., Ikegami Y., Morii R., Sugiyama M., Kadobayashi M., Iwakawa S. Effect of ethanol on S-warfarin and diclofenac metabolism by recombinant human CYP2C9 1 // *Biol. Pharm. Bull.* – 2009. – V. 32. – №. 3. – P. 517-519.
256. Liu Y., Jeong H., Takahashi H., Drozda K., Patel S.R., Shapiro N.L., Nutescu E.A., Cavallari L.H. Decreased warfarin clearance associated with the *CYP2C9* R150H (*8) polymorphism // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2012. – V. 91. – №. 4. – P. 660-665.
257. Du H., Wei Z., Yan Y., Xiong Y., Zhang X., Shen L., Ruan Y., Wu X., Xu Q., He L., Qin S. Functional characterization of human CYP2C9 allelic variants in COS-7 cells // *Frontiers in pharmacology.* – 2016. – V. 7. – P. 98.
258. Michalkiewicz S., Skorupa A., Jakubczyk M. Carbon materials in electroanalysis of preservatives: a review // *Materials.* – 2021. – V. 14. – №. 24. – P. 7630.
259. Salinas-Torres D., Huerta F., Montilla F., Morallón E. Study on electroactive and electrocatalytic surfaces of single walled carbon nanotube-modified electrodes // *Electrochim. Acta.* – 2011. – V. 56. – №. 5. – P. 2464-2470.
260. Habibi B., Abazari M., Pournaghi-Azar M.H. Simultaneous determination of codeine and caffeine using single-walled carbon nanotubes modified carbon-ceramic electrode // *Colloids Surf., B.* – 2014. – V. 114. – P. 89-95.

261. Kumar V., Rock D.A., Warren C.J., Tracy T.S., Wahlstrom J.L. Enzyme source effects on CYP2C9 kinetics and inhibition // Drug Metab. Dispos. – 2006. – V. 34. – №. 11. – P. 1903-1908.
262. Bourrié M., Meunier V., Berger Y., Fabre G. Cytochrome P450 isoform inhibitors as a tool for the investigation of metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1996. – V. 277. – №. 1. – P. 321-332.
263. Zheng Y.F., Bae S.H., Huang Z., Chae S.U., Jo S.J., Shim H.J., Lee C.B., Kim D., Yoo H., Bae S.K. Lack of correlation between *in vitro* and *in vivo* studies on the inhibitory effects of (–)-sophoranone on CYP2C9 is attributable to low oral absorption and extensive plasma protein binding of (–)-sophoranone // Pharmaceutics. – 2020. – V. 12. – №. 4. – P. 328.
264. Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants // Biochem. J. – 1953. – V. 55. – №. 1. – P. 170.
265. Leemann T., Transon C., Dayer P. Cytochrome P450TB (CYP2C): a major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver // Life Sci. – 1993. – V. 52. – №. 1. – P. 29-34.
266. Kim M.S., Kim J.E., Lim D.Y., Huang Z., Chen H., Langfald A., Lubet R.A., Grubbs C.J., Dong Z., Bode A.M. Naproxen induces cell-cycle arrest and apoptosis in human urinary bladder cancer cell lines and chemically induced cancers by targeting PI3K // Cancer Prev. Res. – 2014. – V. 7. – №. 2. – P. 236-245.
267. Rodrigues A.D., Kukulka M.J., Roberts E.M., Ouellet D., Rodgers T.R. [O-methyl 14C] naproxen O-demethylase activity in human liver microsomes: evidence for the involvement of cytochrome P4501A2 and P4502C9/10 // Drug Metab. Dispos. – 1996. – V. 24. – №. 1. – P. 126-136.
268. Miners J.O., Coulter S., Tukey R.H., Veronese M.E., Birkett D.J. Cytochromes P450, 1A2, and 2C9 are responsible for the human hepatic O-demethylation of R- and S-naproxen // Biochem. Pharmacol. – 1996. – V. 51. – №. 8. – P. 1003-1008.
269. Tracy T.S., Marra C., Wrighton S.A., Gonzalez F.J., Korzekwa K.R. Involvement of multiple cytochrome P450 isoforms in naproxen O-demethylation // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 1997. – V. 52. – P. 293-298.

270. McGinnity D.F., Griffin S.J., Moody G.C., Voice M., Hanlon S., Friedberg T., Riley R.J. Rapid characterization of the major drug-metabolizing human hepatic cytochrome P-450 enzymes expressed in *Escherichia coli* // Drug Metab. Dispos. – 1999. – V. 27. – № 9. – P. 1017-1023.
271. Qian L., Thiruppathi A.R., Elmahdy R., van der Zalm J., Chen A. Graphene-oxide-based electrochemical sensors for the sensitive detection of pharmaceutical drug naproxen // Sensors. – 2020. – V. 20. – № 5. – P. 1252.
272. Hendawy H.A., Salem W.M., Abd-Elmonem M.S., Khaled E. Nanomaterial-based carbon paste electrodes for voltammetric determination of naproxen in presence of its degradation products // J. Anal. Methods Chem. – 2019. – V. 2019. – P. 5381031-5381031.
273. Panizza M., Michaud P.A., Cerisola G., Comninellis C. Anodic oxidation of 2-naphthol at boron-doped diamond electrodes // J. Electroanal. Chem. – 2001. – V. 507. – № 1-2. – P. 206-214.
274. Tsai M.C., Chen P.Y. Electrochemical detection of 2-naphthol at a glassy carbon electrode modified with tosflex film // Electroanalysis. – 2007. – V. 19. – № 12. – P. 1315-1321.
275. Zajkoska S.P., Mulone A., Hansal W.E., Klement U., Mann R., Kautek W. Alkoxyated β -naphthol as an additive for tin plating from chloride and methane sulfonic acid electrolytes // Coatings. – 2018. – V. 8. – № 2. – P. 79.
276. Chen W., Dong J., Zhou S., Zhang C., Fu D. Electrochemical mineralization of 1-naphthol and 2-naphthol using boron-doped diamond anodes: factor analysis and mechanisms study // J. Electroanal. Chem. – 2019. – V. 850. – P. 113399.
277. Korzekwa K.R., Krishnamachary N., Shou M., Ogai A., Parise R.A., Rettie A.E., Gonzalez F.J., Tracy T.S. Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites // Biochemistry. – 1998. – V. 37. – № 12. – P. 4137-4147.
278. Hummel M.A., Dickmann L.J., Rettie A.E., Haining R.L., Tracy T.S. Differential activation of CYP2C9 variants by dapsone // Biochem. Pharmacol. – 2004. – V. 67. – № 10. – P. 1831-1841.

279. Kumar V., Locuson C.W., Sham Y.Y., Tracy T.S. Amiodarone analog-dependent effects on CYP2C9-mediated metabolism and kinetic profiles // *Drug Metab. Dispos.* – 2006. – V. 34. – №. 10. – P. 1688-1696.
280. Henderson L.M., Hopkins S.E., Boyer B.B., Thornton T.A., Rettie A.E., Thummel K.E. *In vivo* functional effects of CYP2C9 M1L, a novel and common variant in the Yup'ik Alaska Native population // *Drug Metab. Dispos.* – 2021. – V. 49. – №. 5. – P. 345-352.
281. McDonald M.G., Henderson L.M., Ray S., Yeung C.K., Johnson A.L., Kowalski J.P., Hanenberg H., Wiek C., Thummel K.E., Rettie A.E. Heterologous expression and functional characterization of novel CYP2C9 variants identified in the Alaska native people // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2020. – V. 374. – №. 2. – P. 233-240.
282. Leow J.W.H., Tang L.W.T., Chan E.C.Y. Atypical kinetics of cytochrome P450 enzymes in pharmacology and toxicology // *Adv. Pharmacol.* – 2022. – V. 95. – P. 131-176.
283. Bisswanger H. *Enzyme kinetics: principles and methods* / 3rd edition. – John Wiley & Sons, Weinheim, Germany, 2017.
284. Tracy T.S. Atypical cytochrome P450 kinetics: implications for drug discovery // *Drugs in R & D.* – 2006. – V. 7. – P. 349-363.
285. Leow J.W.H., Chan E.C.Y. Atypical Michaelis-Menten kinetics in cytochrome P450 enzymes: a focus on substrate inhibition // *Biochem. Pharmacol.* – 2019. – V. 169. – P. 113615.
286. Hutzler J.M., Tracy T.S. Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions // *Drug Metab. Dispos.* – 2002. – V. 30. – №. 4. – P. 355-362.
287. Nakajima M., Sakata N., Ohashi N., Kume T., Yokoi T. Involvement of multiple UDP-glucuronosyltransferase 1A isoforms in glucuronidation of 5-(4'-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin in human liver microsomes // *Drug Metab. Dispos.* – 2002. – V. 30. – №. 11. – P. 1250-1256.
288. Giancarlo G.M., Venkatakrishnan K., Granda B.W., von Moltke L.L., Greenblatt D.J. Relative contributions of CYP2C9 and 2C19 to phenytoin 4-

hydroxylation *in vitro*: inhibition by sulfaphenazole, omeprazole, and ticlopidine // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2001. – V. 57. – P. 31-36.

289. Verrotti A., Lattanzi S., Brigo F., Zaccara G. Pharmacodynamic interactions of antiepileptic drugs: from bench to clinical practice // Epilepsy Behav. – 2020. – V. 104. – P. 106939.

290. Trišović N.P., Božić B.D., Lović J.D., Vitnik V.D., Vitnik Ž.J., Petrović S.D., Ivić M.L.A. Electrochemical characterization of phenytoin and its derivatives on bare gold electrode // Electrochim. Acta. – 2015. – V. 161. – P. 378-387.

291. Venkatakrisnan K., Von Moltke L.L., Greenblatt D.J. Effects of the antifungal agents on oxidative drug metabolism: clinical relevance // Clin. Pharmacokinet. – 2000. – V. 38. – P. 111-180.

292. Pea F., Furlanut M. Pharmacokinetic aspects of treating infections in the intensive care unit: focus on drug interactions // Clin. Pharmacokinet. – 2001. – V. 40. – P. 833-868.

293. Cederbaum A. I. CYP2E1--biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury // Mt. Sinai J. Med. – 2006. – V. 73. – №. 4. – P. 657-672.

294. Doody E.E., Groebner J.L., Walker J.R., Frizol B.M., Tuma D.J., Fernandez D.J., Tuma P.L. Liver and biliary tract physiology/pathophysiology: Ethanol metabolism by alcohol dehydrogenase or cytochrome P450 2E1 differentially impairs hepatic protein trafficking and growth hormone signaling // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2017. – V. 313. – №. 6. – P. G558.

295. Jiang Y., Zhang T., Kusumanchi P., Han S., Yang Z., Liangpunsakul S. Alcohol metabolizing enzymes, microsomal ethanol oxidizing system, cytochrome P450 2E1, catalase, and aldehyde dehydrogenase in alcohol-associated liver disease // Biomedicines. – 2020. – V. 8. – №. 3. – P. 50.

296. Guengerich F.P. Cytochrome P450 2E1 and its roles in disease // Chem.-Biol. Interact. – 2020. – V. 322. – P. 109056.

297. Chen J., Jiang S., Wang J., Renukuntla J., Sirimulla S., Chen J. A comprehensive review of cytochrome P450 2E1 for xenobiotic metabolism // Drug Metab. Rev. – 2019. – V. 51. – №. 2. – P. 178-195.

298. Urquhart B.L., Nolin T.D. Drug metabolism in chronic kidney disease // *Chronic Renal Disease*. – 2nd edition. – Academic Press, 2020. – Ch. 63. – P. 1035-1051.
299. Kumar S., Singla B., Singh A.K., Thomas-Gooch S.M., Zhi K., Singh U.P. Hepatic, extrahepatic and extracellular vesicle cytochrome p450 2E1 in alcohol and acetaminophen-mediated adverse interactions and potential treatment options // *Cells*. – 2022. – V. 11. – №. 17. – P. 2620.
300. Peter R., Boecker R., Beaune P.H., Iwasaki M., Guengerich F.P., Yang C.S. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1 // *Chem. Res. Toxicol.* – 1990. – V. 3. – №. 6. – P. 566-573.
301. Mehvar R., Vuppugalla R. Hepatic disposition of the cytochrome P450 2E1 marker chlorzoxazone and its hydroxylated metabolite in isolated perfused rat livers // *J. Pharm. Sci.* – 2006. – V. 95. – №. 7. – P. 1414-1424.
302. Vergeres G., Waskell L. Cytochrome b_5 , its functions, structure and membrane topology // *Biochimie*. – 1995. – V. 77. – №. 7-8. – P. 604-620.
303. Zhang H., Gao N., Liu T., Fang Y., Qi B., Wen Q., Zhou J., Jia L., Qiao H. Effect of cytochrome b_5 content on the activity of polymorphic CYP1A2, 2B6, and 2E1 in human liver microsomes // *PloS one*. – 2015. – V. 10. – №. 6. – P. e0128547.
304. Abbar J.C., Nandibewoor S.T. Development of electrochemical method for the determination of chlorzoxazone drug and its analytical applications to pharmaceutical dosage form and human biological fluids // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 2012. – V. 51. – №. 1. – P. 111-118.
305. Baniahmad B., Hassani Nadiki H., Jahani S., Nezamabadi-Pour N., Toolabi A., Foroughi M.M. Simultaneous electrochemical determination of chlorzoxazone and diclofenac on an efficient modified glassy carbon electrode by lanthanum oxide@ copper (I) sulfide composite // *Front. Chem.* – 2022. – V. 10. – P. 889590.
306. Langes Handbook of Chemistry / edited by Dean J.A. – 11th edition. – McGraw-Hill, New York, USA, 1999. – V. 8. – P. 24.
307. Stewart J.T., Janicki C.A. Chlorzoxazone // *Analytical profiles of drug substances*. – Academic Press, 1987. – V. 16. – P. 119-144.

308. Krishnan S., Wasalathanthri D., Zhao L., Schenkman J.B., Rusling J.F. Efficient bioelectronic actuation of the natural catalytic pathway of human metabolic cytochrome P450s // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – V. 133. – №. 5. – P. 1459-1465.
309. Eagling V.A., Tjia J.F., Back D.J. Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 1998. – V. 45. – №. 2. – P. 107-114.
310. Lucas D., Ferrara R., Gonzalez E., Bodenez P., Albores A., Manno M., Berthou F. Chlorzoxazone, a selective probe for phenotyping CYP2E1 in humans // *Pharmacogenet. Genomics.* – 1999. – V. 9. – №. 3. – P. 377-388.
311. Ono S., Hatanaka T., Hotta H., Tsutsui M., Satoh T., Gonzalez F.J. Chlorzoxazone is metabolized by human CYP1A2 as well as by human CYP2E1 // *Pharmacogenet. Genomics.* – 1995. – V. 5. – №. 3. – P. 143-150.
312. Fu T., Zheng Q., Zhang H. Investigation of the molecular and mechanistic basis for the regioselective metabolism of midazolam by cytochrome P450 3A4 // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2022. – V. 24. – №. 14. – P. 8104-8112.
313. Samuels E.R., Sevrioukova I. Inhibition of human CYP3A4 by rationally designed ritonavir-like compounds: impact and interplay of the side group functionalities // *Mol. Pharmaceutics.* – 2018. – V. 15. – №. 1. – P. 279-288.
314. Deb S., Chin M.Y., Adomat H., Guns E.S.T. Abiraterone inhibits 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 metabolism by CYP3A4 in human liver and intestine *in vitro* // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2014. – V. 144. – P. 50-58.
315. Torimoto N., Ishii I., Hata M., Nakamura H., Imada H., Ariyoshi N., Ohmori S., Igarashi T., Kitada M. Direct interaction between substrates and endogenous steroids in the active site may change the activity of cytochrome P450 3A4 // *Biochemistry.* – 2003. – V. 42. – №. 51. – P. 15068-15077.
316. Lee S., Kim A.H., Yoon S., Lee J., Lee Y., Ji S.C., Yoon S.H., Lee S., Yu K.S., Jang I.J., Cho J.Y. The utility of CYP3A activity endogenous markers for evaluating drug-drug interaction between sildenafil and CYP3A inhibitors in healthy subjects // *Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2021. – V. 36. – P. 100368.

317. Brian W.R., Sari M.A., Iwasaki M., Shimada T., Kaminsky L.S., Guengerich F.P. Catalytic activities of human liver cytochrome P-450 IIIA4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochemistry*. – 1990. – V. 29. – №. 51. – P. 11280-11292.
318. Ged C., Rouillon J.M., Pichard L., Combalbert J., Bressot N., Bories P., Michel H., Beaune P., Maurel P. The increase in urinary excretion of 6 beta-hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450IIIA induction // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 1989. – V. 28. – №. 4. – P. 373-387.
319. Peng C.C., Templeton I., Thummel K.E., Davis C., Kunze K.L., Isoherranen N. Evaluation of 6 β -hydroxycortisol, 6 β -hydroxycortisone, and a combination of the two as endogenous probes for inhibition of CYP3A4 *in vivo* // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2011. – V. 89. – №. 6. – P. 888-895.
320. Zhiri A., Wellman-Bednawska M., Siest G. ELISA of 6-beta-hydroxycortisol in human urine: diurnal variations and effects of antiepileptic therapy // *Clin. Chim. Acta.* – 1986. – V. 157. – №. 3. – P. 267-276.
321. Manz B., Grill H.J., Pollow K. Steroid side-chain modification and receptor affinity: binding of synthetic derivatives of corticoids to human spleen tumor and rat liver glucocorticoid receptors // *J. Steroid Biochem.* – 1982. – V. 17. – №. 3. – P. 335-342.
322. Roots I., Holbe R., Hövermann W., Nigam S., Heinemeyer G., Hildebrandt A.G. Quantitative determination by HPLC of urinary 6 β -hydroxycortisol, an indicator of enzyme induction by rifampicin and antiepileptic drugs // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 1979. – V. 16. – P. 63-71.
323. Nakamura J., Yakata M. Age-and sex-related differences in urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol in humans // *Clin. Chim. Acta.* – 1985. – V. 152. – №. 1-2. – P. 193-197.
324. Ono T., Tanida K., Shibata H., Konishi H., Shimakawa, H. High-performance liquid chromatographic determination of 6 β -hydroxycortisol in urine // *Chem. Pharm. Bull.* – 1986. – V. 34. – №. 6. – P. 2522-2527.
325. Inoue S., Inokuma, M. Harada T., Shibutani Y., Yoshitake T., Charles B., Ishida J., Yamaguchi M. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of 6 β -hydroxycortisol and cortisol in urine with fluorescence detection and

its application for estimating hepatic drug-metabolizing enzyme induction // J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. – 1994. – V. 661. – №. 1. – P. 15-23.

326. Lykkesfeldt J., Loft S., Poulsen H.E. Simultaneous determination of urinary free cortisol and 6 β -hydroxycortisol by high-performance liquid chromatography to measure human CYP3A activity // J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. – 1994. – V. 660. – №. 1. – P. 23-29.

327. Doležalová M. Routine high-performance liquid chromatographic determination of urinary unconjugated cortisol using solid-phase extraction and ultraviolet detection // Clin. Chim. Acta. – 1994. – V. 231. – №. 2. – P. 129-137.

328. Ohno M., Yamaguchi I., Ito T., Saiki K., Yamamoto I., Azuma J. Circadian variation of the urinary 6 β -hydroxycortisol to cortisol ratio that would reflect hepatic CYP3A activity // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2000. – V. 55. – P. 861-865.

329. Ohno M., Yamaguchi I., Saiki K., Yamamoto I., Azuma J. Specific determination of urinary 6 β -hydroxycortisol and cortisol by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry // J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. – 2000. – V. 746. – №. 1. – P. 95-101.

330. Barrett Y.C., Akinsanya B., Chang S.Y., Vesterqvist O. Automated on-line SPE LC–MS/MS method to quantitate 6 β -hydroxycortisol and cortisol in human urine: use of the 6 β -hydroxycortisol to cortisol ratio as an indicator of CYP3A4 activity // J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. – 2005. – V. 821. – №. 2. – P. 159-165.

331. Ma Y.C., Kim H.Y. Determination of steroids by liquid chromatography/mass spectrometry // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 1997. – V. 8. – №. 9. – P. 1010-1020.

332. Yoshimoto F.K., Auchus R.J. The diverse chemistry of cytochrome P450 17A1 (P450c17, CYP17A1) // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2015. – V. 151. – P. 52-65.

333. Monder C., Kendall J. Sulfuric acid-induced fluorescence of corticosteroids: effects of position substituents on fluorescence // Anal. Biochem. – 1975. – V. 68. – №. 1. – P. 248-254.

334. James V.H.T., Honour J.W., Fraser R. Analysis of corticosteroids, corticosteroid metabolites and related compounds in body fluids and tissues // Steroid analysis. –Springer Netherlands, 1995. – P. 229-267.
335. Abel S.M., Back D.J. Cortisol metabolism *in vitro* – III. Inhibition of microsomal 6 β -hydroxylase and cytosolic 4-ene-reductase // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 1993. – V. 46. – №. 6. – P. 827-832.
336. Greenblatt D.J., Zhao Y., Venkatakrishnan K., Duan S.X., Harmatz J.S., Parent S.J., Court M.H., von Moltke L.L. Mechanism of cytochrome P450-3A inhibition by ketoconazole // J. Pharm. Pharmacol. – 2011. – V. 63. – №. 2. – P. 214-221.
337. Jiki Z., Lecour S., Nduhirabandi F. Cardiovascular benefits of dietary melatonin: a myth or a reality? // Front. Physiol. – 2018. – V. 9. – P. 357016.
338. Cheng Z.N., Shu Y., Liu Z.Q., Wang L.S., Ou-Yang D.S., Zhou H.H. Role of cytochrome P450 in estradiol metabolism *in vitro* // Acta Pharmacol Sin. – 2001. – V. 22. – №. 2. – P. 148-154.
339. Ogburn E.T., Jones D.R., Masters A.R., Xu C., Guo Y., Desta Z. Efavirenz primary and secondary metabolism *in vitro* and *in vivo*: identification of novel metabolic pathways and cytochrome P450 2A6 as the principal catalyst of efavirenz 7-hydroxylation // Drug Metab. Dispos. – 2010. – V. 38. – №. 7. – P. 1218-1229.
340. Restrepo J.G., Garcia-Martin E., Martinez C., Agundez J.A. Polymorphic drug metabolism in anaesthesia // Curr. Drug Metab. – 2009. – V. 10. – №. 3. – P. 236-246.
341. Baldwin S.J., Clarke S.E., Chenery R.J. Characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in the *in vitro* metabolism of rosiglitazone // Br. J. Clin. Pharmacol. – 1999. – V. 48. – №. 3. – P. 424-432.
342. Ufer M. Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol // Clin. Pharmacokinet. – 2005. – V. 44. – P. 1227-1246.
343. Bort R., Macé K., Boobis A., Gómez-Lechón M.J., Pfeifer A., Castell J. Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways // Biochem. Pharmacol. – 1999. – V. 58. – №. 5. – P. 787-796.

344. Yamanaka H., Nakajima M., Hara Y., Katoh M., Tachibana O., Yamashita J., Yokoi T. Urinary excretion of phenytoin metabolites, 5-(4'-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin and its O-glucuronide in humans and analysis of genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases // Drug Metab. Pharmacokinet. – 2005. – V. 20. – №. 2. – P. 135-143.
345. Vogl S., Lutz R.W., Schönfelder G., Lutz W.K. CYP2C9 genotype vs. metabolic phenotype for individual drug dosing – a correlation analysis using flurbiprofen as probe drug // PLoS One. – 2015. – V. 10. – №. 3. – P. e0120403.
346. Piatkov I., Rochester C., Jones T., Boyages S. Warfarin toxicity and individual variability – clinical case // Toxins. – 2010. – V. 2. – №. 11. – P. 2584-2592.
347. Miura M., Tada H., Yasui-Furukori N., Uno T., Sugawara K., Tateishi T., Suzuki T. Pharmacokinetic differences between the enantiomers of lansoprazole and its metabolite, 5-hydroxylansoprazole, in relation to CYP2C19 genotypes // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2004. – V. 60. – P. 623-628.
348. Wienkers L.C., Wurden C.J., Storch E., Kunze K.L., Rettie A.E., Trager W.F. Formation of (*R*)-8-hydroxywarfarin in human liver microsomes. A new metabolic marker for the (*S*)-mephenytoin hydroxylase, P4502C19 // Drug Metab. Dispos. – 1996. – V. 24. – №. 5. – P. 610-614.
349. Klaassen T., Jetter A., Tomalik-Scharte D., Kasel D., Kirchheiner J., Jaehde U., Fuhr U. Assessment of urinary mephenytoin metrics to phenotype for CYP2C19 and CYP2B6 activity // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2008. – V. 64. – P. 387-398.
350. Ebner T., Eichelbaum M. The metabolism of aprindine in relation to the sparteine/debrisoquine polymorphism // Br. J. Clin. Pharmacol. – 1993. – V. 35. – №. 4. – P. 426-430.
351. Dinh J.C., Pearce R.E., Van Haandel L., Gaedigk A., Leeder J.S. Characterization of atomoxetine biotransformation and implications for development of PBPK models for dose individualization in children // Drug Metab. Dispos. – 2016. – V. 44. – №. 7. – P. 1070-1079.

352. Lantz R.J., Gillespie T.A., Rash T.J., Kuo F., Skinner M., Kuan H.Y., Knadler M.P. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of duloxetine in healthy human subjects // *Drug Metab. Dispos.* – 2003. – V. 31. – №. 9. – P. 1142-1150.

353. Wang Z., Wang L., Xu R.A., Zhan Y.Y., Huang C.K., Dai D.P., Cai J.P., Hu G.X. Role of cytochrome P450 2D6 genetic polymorphism in carvedilol hydroxylation *in vitro* // *Drug Des., Dev. Ther.* – 2016. – V. 10. – P. 1909-1916.

354. Bakken G.V., Rudberg I., Christensen H., Molden E., Refsum H., Hermann M. Metabolism of quetiapine by CYP3A4 and CYP3A5 in presence or absence of cytochrome *b*₅ // *Drug Metab. Dispos.* – 2009. – V. 37. – №. 2. – P. 254-258.

355. Okubo M., Murayama N., Miura J., Chiba Y., Yamazaki H. Effects of cytochrome P450 2D6 and 3A5 genotypes and possible coadministered medicines on the metabolic clearance of antidepressant mirtazapine in Japanese patients // *Biochem. Pharmacol.* – 2015. – V. 93. – №. 1. – P. 104-109.

356. Nakamura K., Yokoi T., Inoue K., Shimada N., Ohashi N., Kume T., Kamataki T. CYP2D6 is the principal cytochrome P450 responsible for metabolism of the histamine 111 antagonist promethazine in human liver microsomes // *Pharmacogenet. Genomics.* – 1996. – V. 6. – №. 5. – P. 449-457.

357. Afshar M., Rouini M. A rapid HPLC assay for the simultaneous determination of propafenone and its major metabolites in human serum // *Anal. Sci.* – 2004. – V. 20. – №. 9. – P. 1307-1311.

358. Upthagrove A.L., Nelson W.L. Importance of amine pK_a and distribution coefficient in the metabolism of fluorinated propranolol derivatives. Preparation, identification of metabolite regioisomers, and metabolism by CYP2D6 // *Drug Metab. Dispos.* – 2001. – V. 29. – №. 11. – P. 1377-1388.

359. Lyon E., Gastier Foster J., Palomaki G.E., Pratt V.M., Reynolds K., Sábato M.F., Scott S.A., Vitazka P. Laboratory testing of CYP2D6 alleles in relation to tamoxifen therapy // *Genet. Med.* – 2012. – V. 14. – №. 12. – P. 990-1000.

360. Mürdter T.E., Kerb R., Turpeinen M., Schroth W., Ganchev B., Böhmer G.M., Igel S., Schaeffeler E., Zanger U., Brauch H., Schwab M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2D6 determines oestrogen receptor activity of the major infertility

drug clomiphene via its active metabolites // Hum. Mol. Genet. – 2012. – V. 21. – №. 5. – P. 1145-1154.

361. Yamamura Y., Koyama N., Umehara K. Comprehensive kinetic analysis and influence of reaction components for chlorzoxazone 6-hydroxylation in human liver microsomes with CYP antibodies // Xenobiotica. – 2015. – V. 45. – №. 4. – P. 353-360.

362. Liu A., Wu Q., Guo J., Ares I., Rodríguez J.L., Martínez-Larrañaga M.R., Yuan Z., Anadón A., Wang X., Martínez M.A. Statins: Adverse reactions, oxidative stress and metabolic interactions // Pharmacol. Ther. – 2019. – V. 195. – P. 54-84.

363. Fan-Havard P., Liu Z., Chou M., Ling Y., Barrail-Tran A., Haas D.W., Taburet A. Pharmacokinetics of phase I nevirapine metabolites following a single dose and at steady state // Antimicrob. Agents Chemother. – 2013. – V. 57. – №. 5. – P. 2154-2160.

364. Wen B., Ma L., Rodrigues A.D., Zhu M. Detection of novel reactive metabolites of trazodone: evidence for CYP2D6-mediated bioactivation of m-chlorophenylpiperazine // Drug Metab. Dispos. – 2008. – V. 36. – №. 5. – P. 841-850.

365. Zhang H., Cui D., Wang B., Han Y.H., Balimane P., Yang Z., Sinz M., Rodrigues A.D. Pharmacokinetic drug interactions involving 17 α -ethinylestradiol: a new look at an old drug // Clin. Pharmacokinet. – 2007. – V. 46. – P. 133-157.

366. Nakajima M., Inoue T., Shimada N., Tokudome S., Yamamoto T., Kuroiwa Y. Cytochrome P450 2C9 catalyzes Indomethacin O-Demethylation in human liver microsomes // Drug Metab. Dispos. – 1998. – V. 26. – №. 3. – P. 261-266.

367. Pan P.P., Weng Q.H., Zhou C.J., Wei Y.L., Wang L., Dai D.P., Cai J.P., Hu G.X. The role of CYP2C9 genetic polymorphism in carvedilol O-desmethylation *in vitro* // Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. – 2016. – V. 41. – P. 79-86.

368. Magalhães P., Alves G., Llerena A., Falcão A. Venlafaxine pharmacokinetics focused on drug metabolism and potential biomarkers // Drug Metab. Drug Interact. – 2014. – V. 29. – №. 3. – P. 129-141.

369. Bachus R. Bickel U., Thomsen T., Roots I., Kewitz H. The O-demethylation of the antidementia drug galanthamine is catalysed by cytochrome P450 2D6 // Pharmacogenet. Genomics. – 1999. – V. 9. – №. 6. – P. 661-668.

370. Fang P., Zheng X., He J., Ge H., Tang P., Cai J., Hu G. Functional characterization of wild-type and 24 CYP2D6 allelic variants on gefitinib metabolism *in vitro* // Drug Des., Dev. Ther. – 2017. – V. 11. – P. 1283-1290.
371. Barakat N.H., Atayee R.S., Best B. M., Pesce A.J. Relationship between the concentration of hydrocodone and its conversion to hydromorphone in chronic pain patients using urinary excretion data // J. Anal. Toxicol. – 2012. – V. 36. – №. 4. – P. 257-264.
372. Kim J., Lim Y.R., Han S., Han J.S., Chun Y.J., Yun C.H., Lee C.H., Kim D. Functional influence of human CYP2D6 allelic variations: P34S, E418K, S486T, and R296C // Arch. Pharmacol Res. – 2013. – V. 36. – P. 1500-1506.
373. Mikus G., Weiss J. Influence of CYP2D6 genetics on opioid kinetics, metabolism and response // Curr. Pharmacogenomics. – 2005. – V. 3. – №. 1. – P. 43-52.
374. Samer C. F., Daali Y., Wagner M., Hopfgartner G., Eap C.B., Rebsamen M.C., Rossier M.F, Hochstrasser D., Dayer P., Desmeules J.A. Genetic polymorphisms and drug interactions modulating CYP2D6 and CYP3A activities have a major effect on oxycodone analgesic efficacy and safety // Br. J. Pharmacol. – 2010. – V. 160. – №. 4. – P. 919-930.
375. Doki K., Sekiguchi Y., Kuga K., Aonuma K., Homma M. Serum flecainide S/R ratio reflects the CYP2D6 genotype and changes in CYP2D6 activity // Drug Metab. Pharmacokinet. – 2015. – V. 30. – №. 4. – P. 257-262.
376. Matsumoto S., Hiramata T., Matsubara T., Nagata K., Yamazoe Y. Involvement of CYP2J2 on the intestinal first-pass metabolism of antihistamine drug, astemizole // Drug Metab. Dispos. – 2002. – V. 30. – №. 11. – P. 1240-1245.
377. Wilkinson D.G. The pharmacology of donepezil: a new treatment for Alzheimer's disease // Expert Opin. Pharmacother. – 1999. – V. 1. – №. 1. – P. 121-135.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица П1. Катализируемые цитохромами P450 реакции метаболизма лекарственных препаратов, приводящие к образованию гидроксильных групп в ароматическом кольце.

Реакции ароматического гидроксирования					
Изофермент CYP	Лекарственный препарат	Анатомо-Терапевтически-Химическая (АТХ) классификация	Реакция*	Метаболиты	Ссылка
CYP1A2	Мелатонин	N05CH – Агонисты мелатониновых рецепторов	6-гидроксирование	6-гидроксимелатонин	[337]
	Миансерин	N06AX – Прочие антидепрессанты	8-гидроксирование	8-гидроксимиансерин	[177]
	Эстрадиол	G03CA – Природные и полусинтетические эстрогены	2-гидроксирование	2-гидроксиэстрадиол	[338]
CYP2A6	Эфавиренз	J05AG – Ненуклеозиды - ингибиторы обратной транскриптазы	7-гидроксирование	7-гидроксиэфавиренз	[339]
CYP2B6	Миансерин	N06AX – Прочие антидепрессанты	8-гидроксирование	8-гидроксимиансерин	[177]
	Пропофол	N01AX – Другие препараты для общей анестезии	4-гидроксирование	4-гидроксипропофол	[340]
	Эфавиренз	J05AG – Ненуклеозиды - ингибиторы обратной транскриптазы	8-гидроксирование	8-гидроксиэфавиренз	[339]
CYP2C8	Росиглитазон	A10BG – Тиазолидинедионы	<i>para</i> -гидроксирование	<i>para</i> -гидроксиросиглитазон	[341]
CYP2C9	Аценокумарол	B01AA – Антагонисты витамина К	6- и 7-гидроксирование	6- или 7-гидроксиаценокумарол	[342]
	Диклофенак	S01BC – Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП)	4'-гидроксирование	4'-гидроксидиклофенак	[343]

	Лорноксикам	M01AC – Оксикамы	5'-гидроксилирование	5'-гидроксилорноксикам	[191]
	Пироксикам	M01AC – Оксикамы	5'-гидроксилирование	5'-гидроксипироксикам	[192]
	Фенитоин	N03AB – Производные гидантоина	4-гидроксилирование	4-гидроксифенитоин	[344]
	Флурбипрофен	S01BC – НПВП	4'-гидроксилирование	4'-гидроксифлурбипрофен	[345]
	(S)-варфарин	B01AA – Антагонисты витамина К	7-гидроксилирование	(S)-7-гидроксиварфарин	[346]
CYP2C19	Лансопразол	A02BC – Ингибиторы протонного насоса	5-гидроксилирование	5-гидроксилансопразол	[347]
	Фенитоин	N03AB – Производные гидантоина	4-гидроксилирование	4-гидроксифенитоин	[344]
	(R)-варфарин	B01AA – Антагонисты витамина К	8-гидроксилирование	(R)-8-гидроксиварфарин	[348]
	(S)-мефенитоин	N03AB – Производные гидантоина	4'-гидроксилирование	(S)-4'-гидроксимефенитоин	[349]
CYP2D6	Априндин	C01BB – Антиаритмические препараты Ib класса	5-гидроксилирование	5-гидроксиаприндин	[350]
	Атомоксетин	N06BA – Симпатомиметики центрального действия	4-гидроксилирование	4-гидроксиатомоксетин	[351]
	Дезипрамин	N06AA – Неселективные ингибиторы обратного захвата моноаминов	2-гидроксилирование	2-гидроксидезипрамин	[179]
	Дулоксетин	N06AX – Прочие антидепрессанты	4-, 5- и 6-гидроксилирование	4-, 5- или 6-гидроксидулоксетин	[352]
	Имипрамин	N06AA – Неселективные ингибиторы обратного захвата моноаминов	2-гидроксилирование	2-гидроксиимипрамин	[179]

	Карведилол	C07AG – Альфа-, бета-адреноблокаторы	4'- и 5'-гидроксилирование	4'- или 5'-гидроксикарведилол	[353]
	Кветиапин	N05AH – Производные диазепина, тиазепина и оксазепина	7-гидроксилирование	7-гидроксикветиапин	[354]
	Миансерин	N06AX – Прочие антидепрессанты	8-гидроксилирование	8-гидроксимиансерин	[176]
	Миртазапин	N06AX – Прочие антидепрессанты	8-гидроксилирование	8-гидроксимиртазапин	[355]
	Прометазин	R06AD – Производные фенотиазина	7-гидроксилирование	7-гидроксипрометазин	[356]
	Пропафенон	C01BC – Антиаритмические препараты Ic класса	5-гидроксилирование	5-гидроксипропафенон	[357]
	Пропранолол	C07AA – Неселективные бета-адреноблокаторы	4'- и 5'-гидроксилирование	4'- или 5'-гидроксипропранолол	[358]
	Тамоксифен	L02BA – Антиэстрогены	4-гидроксилирование	4-гидрокситамоксифен	[359]
	Хлорпромазин	N05AA – Производные фенотиазина с алифатической структурой	7-гидроксилирование	7-гидроксихлорпромазин	[194]
	(E)-кломифен	G03GB – Синтетические стимуляторы овуляции	4-гидроксилирование	4-гидроксикломифен	[360]
CYP2E1	Хлорзоксазон	M03BB – Производные оксазола, тиазина и триазина	6-гидроксилирование	6-гидроксихлорзоксазон	[361]
CYP3A4/3A5	Аторвастатин	C10AA – Ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы	<i>Пара-</i> или <i>орто</i> -гидроксилирование	<i>Пара-</i> и <i>орто</i> -гидроксиаторвастатин	[362]
	Диклофенак	S01BC – НПВП	5-гидроксилирование	5-гидроксидиклофенак	[114]
	Кветиапин	N05AH – Производные диазепина, тиазепина и оксазепина	7-гидроксилирование	7-гидроксикветиапин	[354]
	Миансерин	N06AX – Прочие антидепрессанты	8-гидроксилирование	8-гидроксимиансерин	[177]

	Невирапин	J05AG – Ненуклеозиды - ингибиторы обратной транскриптазы	2-гидроксилирование	2-гидроксиневирапин	[363]
	Тразодон	N06AX – Прочие антидепрессанты	4'-гидроксилирование	4'-гидрокситразодон	[364]
	Этинилэстрадиол	L02AA – Эстрогены	2-гидроксилирование	2-гидроксиэтинилэстрадиол	[365]
Реакции деалкилирования					
CYP1A2	Мелатонин	N05CH – Агонисты мелатониновых рецепторов	О-деметилирование	N-ацетилсеротонин	[337]
	Миансерин	N06AX – Прочие антидепрессанты	N-деметилирование	N-десметилмиансерин	[177]
	Напроксен	S01BC – НПВП	О-деметилирование	О-десметилнапроксен	[268]
	Фенацетин	N02BE – Анилиды	О-деэтилирование	О-деэтилфенацетин (Ацетаминофен, парацетамол)	[202]
CYP2C9	Индометацин	S01BC – НПВП	О-деметилирование	О-десметилиндометацин	[366]
	Карведилол	C07AG – Альфа-, бета-адреноблокаторы	О-деметилирование	О-десметилкарведилол	[367]
CYP2C19	Мелатонин	N05CH – Агонисты мелатониновых рецепторов	О-деметилирование	N-ацетилсеротонин	[337]
CYP2D6	Венлафаксин	N06AX – Прочие антидепрессанты	О-деметилирование	О-десметилвенлафаксин	[368]
	Галантамин	N06DA – Ингибиторы холинэстеразы	О-деметилирование	О-десметилгалантамин	[369]
	Гефитиниб	L01XE – Ингибиторы протеинкиназы	О-деметилирование	О-десметилигефитиниб	[370]
	Гидрокодон	R05DA – Алколоиды опиума и его производные	О-деметилирование	О-десметилгидрокодон	[371]

	Декстрометорфан	R05DA – Алколоиды опия и его производные	О-деметилирование	Декстрорфан	[372]
	Дигидрокодеин	N02AA – Природные алколоиды опия	О-деметилирование	Дигидроморфин	[373]
	Кодеин	R05DA – Алколоиды опия и его производные	О-деметилирование	Морфин	[205]
	Оксикодон	N02AA – Природные алколоиды опия	О-деметилирование	О-десметилоксикодон	[374]
	Трамадол	N02AX – Прочие опиоиды	О-деметилирование	О-десметилтрамадол	[206]
	Флекаинид	C01BC – Антиаритмические препараты Ic класса	<i>мета</i> -О-деалкилирование	Мета-О-деалкилфлекаинид	[375]
CYP2J2	Астемизол	R06AX – Прочие антигистаминные препараты для системного применения	О-деметилирование	О-десметиластемизол	[376]
CYP3A4/3A5	Донепезил	N06DA – Ингибиторы холинэстеразы	О-деметилирование	О-десметилдонепезил	[377]

Примечание: Указанные реакции могут быть как основными, так и одними из возможных для соответствующих субстратов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность за неоценимую помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы научному консультанту, заведующему лабораторией биоэлектрохимии ИБМХ, профессору кафедры биохимии МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, д.б.н., профессору Шумянцевой Виктории Васильевне, сотруднику Института мультидисциплинарных исследований Общества Макса Планка (Геттинген, Германия), д.б.н. Мошковскому Сергею Александровичу, доценту кафедры биохимии МБФ, старшему научному сотруднику лаборатории биокаталитических систем ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, младшему научному сотруднику лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ, к.б.н. Масамреху Рами Ахмаду, младшему научному сотруднику лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ, ассистенту кафедры биохимии МБФ, младшему научному сотруднику лаборатории биокаталитических систем ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России Филипповой Татьяне Андреевне, старшему научному сотруднику лаборатории биокаталитических систем ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, к.в.н. Худоклиновой Юлии Юрьевне, старшему научному сотруднику лаборатории структурно-функционального конструирования лекарств ИБМХ, к.б.н. Дмитриеву Александру Викторовичу, научному сотруднику лаборатории структурно-функционального конструирования лекарств ИБМХ, к.б.н. Погодину Павлу Викторовичу, всему коллективу лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ и всему коллективу кафедры биохимии МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. Автор также благодарит ведущего научного сотрудника лаборатории иммунобиохимии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, д.х.н. Жердева Анатолия Виталиевича и заведующего лабораторией межмолекулярных взаимодействий ИБМХ, д.б.н., профессора Иванова Алексея Сергеевича за критические замечания и ценные рекомендации.