

## ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕТАБОЛИТОВ КАК МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОВ P450

*А.В. Кузиков<sup>1,2</sup>, Р.А. Масамрех<sup>1,2</sup>, Т.А. Филиппова<sup>1,2</sup>, В.В. Шумянцева<sup>1,2\*</sup>*

<sup>1</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1; \*e-mail: v\_shumyantseva@mail.ru

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10

В обзоре рассмотрены методы электрохимического определения метаболитов реакций, катализируемых цитохромами P450. Основной акцент сделан на электрохимическом определении метаболитов лекарственных препаратов и некоторых эндогенных соединений. Рассмотрены биелектродные системы для определения активности цитохромов P450, в которых один электрод выступает в качестве матрицы для иммобилизации фермента и донора электронов для восстановления иона железа гема и инициации каталитической реакции по отношению к субстрату, а второй – для количественного определения образующихся продуктов путем их электрохимического окисления. Такие системы в идеале позволяют избежать дополнительных стадий разделения субстратов и продуктов реакций. В обзоре также обсуждены способы повышения аналитической чувствительности и снижения предела определяемых концентраций исследуемых метаболитов за счет химической модификации электродов. Показаны возможности таких систем для анализа кинетики реакций, катализируемых цитохромами P450, и перспективы их дальнейшего развития, такие как 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.

**Ключевые слова:** цитохромы P450; лекарственные препараты; метаболиты; электрохимия

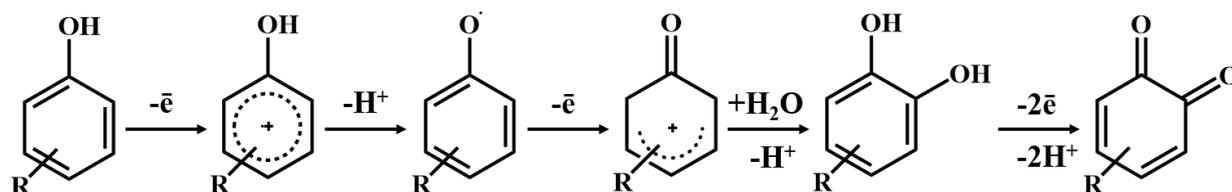
**DOI:** 10.18097/BMCRM00176

### ВВЕДЕНИЕ

Цитохромы P450 (CYP) – суперсемейство гем-тиолатных монооксигеназ, осуществляющих метаболизм как экзогенных, так и эндогенных соединений [1]. Большое число лекарственных препаратов подвергаются метаболизму при участии цитохромов P450. Изменение метаболизма лекарственных препаратов за счет генетических особенностей этих ферментов или возникновение межлекарственных взаимодействий при одновременном использовании нескольких препаратов может служить причиной возникновения нежелательных побочных эффектов [2]. Некоторые изоформы цитохрома P450 катализируют ключевые стадии биосинтеза стероидных гормонов, что обуславливает их значение как молекулярных мишеней для применения лекарственных препаратов, ингибирующих их активность, например, при лечении гормон-зависимых опухолей [3]. Применение эффективных

подходов к анализу активности этих ферментов является важной составляющей фармакокинетического анализа при разработке новых лекарственных препаратов и выявлении возможных межлекарственных взаимодействий.

Цитохромы P450 катализируют реакции гидроксирования алифатических и ароматических соединений, окисления спиртов и аминов, реакции окисления гетероатомов (N, S, P и I), эпоксирирование алкенов и аренов, дегалогенирование, дезаминирование и N-, O- и S-деалкилирование [4]. При участии различных изоформ цитохрома P450 большое число лекарственных препаратов может подвергаться реакциям ароматического гидроксирования или O-деалкилирования, приводящим к образованию гидроксильных групп в составе ароматического кольца (табл. 1). К таким лекарственным препаратам относятся некоторые адрено- и симпатомиметики, адреноблокаторы, антиаритмические средства, антикоагулянты, гипогликемические средства, ингибиторы



**Рисунок 1.** Общий механизм электрохимического окисления соединений, содержащих гидроксифенильные группы.



Таблица 1. Катализируемые цитохромами P450 реакции метаболизма лекарственных препаратов, приводящие к образованию гидроксильных групп в ароматическом кольце.

Изоформа СУР	Реакции ароматического гидроксилирования				Ссылка
	Лекарственный препарат	Анатомо-Терапевтически-Химическая (АТХ) классификация	Реакция*	Метаболиты	
СУР1А2	Мелатонин	N05СН – агонисты мелатониновых рецепторов	6-гидроксилирование	6-гидрокси мелатонин	[5]
	Миансерин	N06АХ – прочие антидепрессанты	8-гидроксилирование	8-гидрокси миансерин	[6]
	Эстрадиол	G03СА – природные и полусинтетические эстрогены	2-гидроксилирование	2-гидроксиэстрадиол	[7]
СУР2А6	Эфавиренз	J05AG – нуклеозиды - ингибиторы обратной транскриптазы	7-гидроксилирование	7-гидроксиэфавиренз	[8]
СУР2В6	Миансерин	N06АХ – прочие антидепрессанты	8-гидроксилирование	8-гидрокси миансерин	[6]
	Пропофол	N01АХ – другие препараты для общей анестезии	4-гидроксилирование	4-гидроксипропофол	[9]
	Эфавиренз	J05AG – нуклеозиды - ингибиторы обратной транскриптазы	8-гидроксилирование	8-гидроксиэфавиренз	[8]
СУР2С8	Росиглитазон	A10BG – тиазолидиндионы	<i>para</i> -гидроксилирование	<i>para</i> -гидроксиросиглитазон	[10]
СУР2С9	Аценокумарол	B01AA – антагонисты витамина К	6- и 7-гидроксилирование	6- или 7-гидроксиаценокумарол	[11]
	Диклофенак	S01BC – нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП)	4'-гидроксилирование	4'-гидрокси диклофенак	[12]
	Лорноксикам	M01AC – оксикамы	5'-гидроксилирование	5'-гидрокси лорноксикам	[13]
	Пироксикам	M01AC – оксикамы	5'-гидроксилирование	5'-гидрокси пироксикам	[14]
	Фенитоин	N03AB – производные гидантоина	4-гидроксилирование	4-гидрокси фенитоин	[15]
	Флурбипрофен	S01BC – нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП)	4'-гидроксилирование	4'-гидрокси флурбипрофен	[16]
СУР2С19	(S)-варфарин	B01AA – антагонисты витамина К	7-гидроксилирование	(S)-7-гидрокси варфарин	[17]
	Лансопрозол	A02BC – ингибиторы протонного насоса	5-гидроксилирование	5-гидрокси лансопрозол	[18]
	Фенитоин	N03AB – производные гидантоина	4-гидроксилирование	4-гидрокси фенитоин	[15]
	(R)-варфарин	B01AA – антагонисты витамина К	8-гидроксилирование	(R)-8-гидрокси варфарин	[19]
	(S)-мефенитоин	N03AB – производные гидантоина	4'-гидроксилирование	(S)-4'-гидрокси мефенитоин	[20]
	Апридин	C01BB – антиаритмические препараты Ib класса	5-гидроксилирование	5-гидрокси апридин	[21]
СУР2D6	Агомексетин	N06BA – симпатомиметики центрального действия	4-гидроксилирование	4-гидрокси агомексетин	[22]
	Дезипрамин	N06AA – неселективные ингибиторы обратного захвата моноаминов	2-гидроксилирование	2-гидрокси дезипрамин	[23]

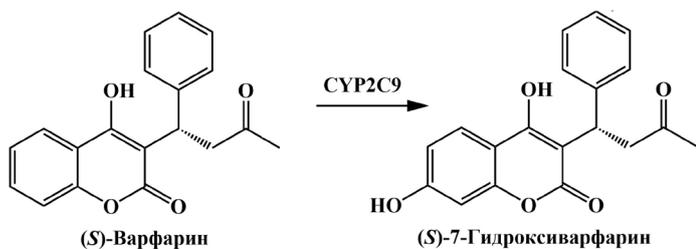
Продолжение таблицы 1. Катализируемые цитохромами P450 реакции метаболизма лекарственных препаратов, приводящие к образованию гидроксильных групп в ароматическом кольце.

СУР2D6	Дулоксетин	N06AX – прочие антидепрессанты	4-, 5- и 6-гидроксилирование	4-, 5- или 6-гидроксидулоксетин	[24]
	Имипрамин	N06AA – неселективные ингибиторы обратного захвата моноаминов	2-гидроксилирование	2-гидроксиимипрамин	[23]
	Карведилол	C07AG – альфа-, бета-адреноблокаторы	4' - и 5' -гидроксилирование	4' - или 5' -гидроксикарведилол	[25]
	Кветиапин	N05AH – производные диазепина, тиазепина и оксазепина	7-гидроксилирование	7-гидроксикуветиапин	[26]
	Миансерин	N06AX – прочие антидепрессанты	8-гидроксилирование	8-гидроксимиансерин	[27]
	Миртазапин	N06AX – прочие антидепрессанты	8-гидроксилирование	8-гидроксимиртазапин	[28]
	Прометазин	R06AD – производные фенотиазина	7-гидроксилирование	7-гидроксипрометазин	[29]
	Пропафенон	C01BC – антиаритмические препараты Ic класса	5-гидроксилирование	5-гидроксипропафенон	[30]
	Пропранолол	C07AA – неселективные бета-адреноблокаторы	4' - и 5' -гидроксилирование	4' - или 5' -гидроксипропранолол	[31]
	Тамоксифен	L02BA – антиэстрогены	4-гидроксилирование	4-гидрокситамоксифен	[32]
	Хлорпромазин	N05AA – производные фенотиазина с алифатической структурой	7-гидроксилирование	7-гидроксихлорпромазин	[33]
	(E)-кломифен	G03GB – синтетические стимуляторы овуляции	4-гидроксилирование	4-гидроксиломифен	[34]
	СУР2E1 СУР3A4/3A5	Хлорзоксазон	M03BB – производные оксазола, тиазина и триазина	6-гидроксилирование	6-гидроксихлорзоксазон
Агортастатин		C10AA – ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы	<i>para</i> - или <i>ortho</i> -гидроксилирование	<i>para</i> - и <i>ortho</i> -гидроксиагортастатин	[36]
Диклофенак		S01BC – нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП)	5-гидроксилирование	5-гидроксидиклофенак	[37]
Кветиапин		N05AH – производные диазепина, тиазепина и оксазепина	7-гидроксилирование	7-гидроксикуветиапин	[26]
Миансерин		N06AX – прочие антидепрессанты	8-гидроксилирование	8-гидроксимиансерин	[6]
Невиртапин		J05AG – нуклеозиды - ингибиторы обратной транскриптазы	2-гидроксилирование	2-гидроксиневиртапин	[38]
Тразодон		N06AX – прочие антидепрессанты	4' -гидроксилирование	4' -гидроксиотразодон	[39]
Этинилэстрадиол		L02AA – эстрогены	2-гидроксилирование	2-гидроксиэтинилэстрадиол	[40]

Продолжение таблицы 1. Катализируемые цитохромами P450 реакции метаболизма лекарственных препаратов, приводящие к образованию гидроксильных групп в ароматическом кольце.

		Реакции деалкилирования			
CYP1A2	Мелатонин	N05CH – агонисты мелатониновых рецепторов	O-деметилирование	N-ацетилсеротонин	[5]
	Миансерин	N06AX – прочие антидепрессанты	N-деметилирование	N-десметилмиансерин	[6]
	Напроксен	S01BC – нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП)	O-деметилирование	O-десметилнапроксен	[41]
CYP2C9	Фенацетин	N02BE – анилиды	O-деэтилирование	O-деэтилфенацетин (Ацетаминофен, парацетамол)	[42]
	Индометацин	S01BC – нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП)	O-деметилирование	O-десметилиндометацин	[43]
	Карведилол	C07AG – альфа-, бета-адреноблокаторы	O-деметилирование	O-десметилкарведилол	[44]
CYP2C19	Мелатонин	N05CH – агонисты мелатониновых рецепторов	O-деметилирование	N-ацетилсеротонин	[5]
	Венлафаксин	N06AX – прочие антидепрессанты	O-деметилирование	O-десметилвенлафаксин	[45]
CYP2D6	Галантамин	N06DA – ингибиторы холинэстеразы	O-деметилирование	O-десметилгалантамин	[46]
	Гэфитиниб	L01XE – ингибиторы протеинкиназы	O-деметилирование	O-десметилгэфитиниб	[47]
	Гидрокодон	R05DA – алколоиды опия и его производные	O-деметилирование	O-десметилгидрокодон	[48]
	Декстрометорфан	R05DA – алколоиды опия и его производные	O-деметилирование	декстрорфан	[49]
	Дигидрокодеин	N02AA – природные алколоиды опия	O-деметилирование	дигидроморфин	[50]
	Кодеин	R05DA – алколоиды опия и его производные	O-деметилирование	морфин	[51]
	Оксикодон	N02AA – природные алколоиды опия	O-деметилирование	O-десметилоксикодон	[52]
	Трамалол	N02AX – прочие опиоиды	O-деметилирование	O-десметилтрамалол	[53]
	Флекаинид	C01BC – антиаритмические препараты Ic класса	мета-O-деалкилирование	мета-O-деалкилфлекаинид	[54]
	Астемизол	R06AX – прочие антигистаминные препараты для системного применения	O-деметилирование	O-десметиластемизол	[55]
CYP3A4/3A5	Донепезил	N06DA – ингибиторы холинэстеразы	O-деметилирование	O-десметилдонепезил	[56]

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



**Рисунок 2.** Реакция метаболизма (S)-варфарина при участии CYP2C9.

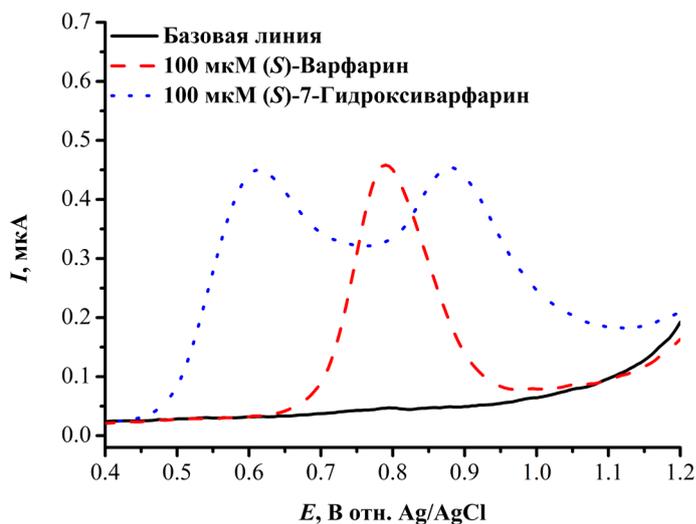
протонного насоса, миорелаксанты, средства для наркоза, нестероидные противовоспалительные средства, противоэпилептические препараты, снотворные, средства для лечения ВИЧ-инфекции, статины, тетрациклические антидепрессанты, эстрогены, гестагены, их гомологи и антагонисты, H1-антигистаминные средства [57]. Многие лекарственные соединения из этих фармакологических групп участвуют в межлекарственных взаимодействиях. Метаболиты цитохром Р450-зависимых реакций, например, содержащие гидроксифенильные группы, образующиеся в результате ароматического гидроксирования, могут быть определены методами электрохимического анализа, поскольку данные соединения легко подвергаются прямому электрохимическому окислению. На рисунке 1 представлен общий механизм электрохимического окисления соединений, содержащих гидроксифенильные группы.

Электрохимический потенциал окисления ароматического кольца меньше, чем в случае окисления алифатических углеводородов, вследствие резонансной стабилизации ароматических катион-радикалов [59]. 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. Гидроксирование ароматических гетероциклов в составе лекарственных препаратов также может влиять на электрохимические свойства таких соединений. Различия в электрохимических свойствах субстратов цитохрома Р450 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.

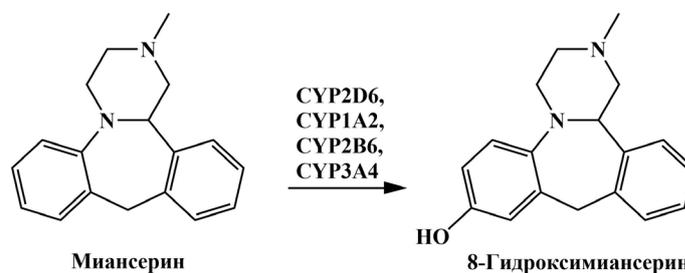
## 1. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИЙ АРОМАТИЧЕСКОГО ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ

Как было сказано выше, метаболиты цитохром Р450-зависимых реакций, образующиеся в результате ароматического гидроксирования, подвергаются прямому электрохимическому окислению при меньших значениях потенциалов, чем в случае окисления соответствующих субстратов. Цитохром Р450 2С9 (CYP2C9) осуществляет реакцию ароматического гидроксирования S-энантиомера антикоагулянтного препарата варфарина до соответствующего метаболита (S)-7-гидроксиварфарина (рис. 2) [60].

Пик электрохимического окисления (S)-варфарина на графитовых электродах, регистрируемый методом



**Рисунок 3.** Квадратно-волновые вольтамперограммы 0.1 М калий-фосфатного буфера (рН 7.4), содержащего 0.05 М NaCl, 1% метанола (по объему) (—), 100 мкМ (S)-варфарина (---) или 100 мкМ (S)-7-гидроксиварфарина (···). Частота сигнала 25 Гц.

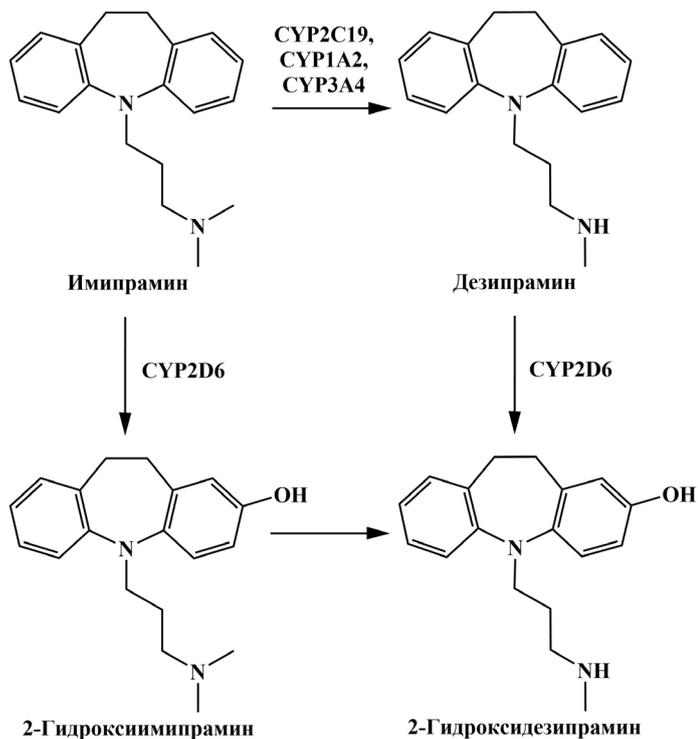


**Рисунок 4.** Реакция метаболизма миансерина при участии CYP2D6, CYP1A2, CYP2B6 и CYP3A4.

квадратно-волновой вольтамперометрии, находится около 0.8 В, а (S)-7-гидроксиварфарин имеет соответствующий окислению гидроксифенильной группы пик около 0.6 В и пик около 0.9 В, отражающий дальнейший процесс окисления метаболита (рис. 3).

Одним из путей метаболизма тетрациклического антидепрессанта миансерина является реакция ароматического гидроксирования с образованием 8-гидроксимиансерина, осуществляемая при участии цитохрома Р450 2D6 (CYP2D6), а также при участии цитохрома Р450 1A2 (CYP1A2), цитохрома Р450 2B6 (CYP2B6), цитохрома Р450 3A4 (CYP3A4) (рис. 4) [6, 27]. 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 [61]. 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.

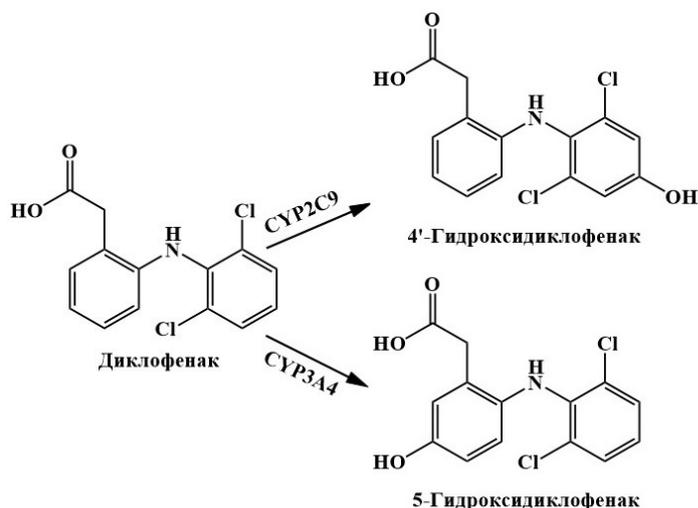
Трициклический антидепрессант имипрамин при участии CYP2D6 подвергается ароматическому гидроксированию с образованием 2-гидроксимипрамина (рис. 5) [23]. Кроме того, N-деметилирование имипрамина при участии CYP1A2, CYP2C19 и CYP3A4 приводит к образованию дезипрамина, который подвергается



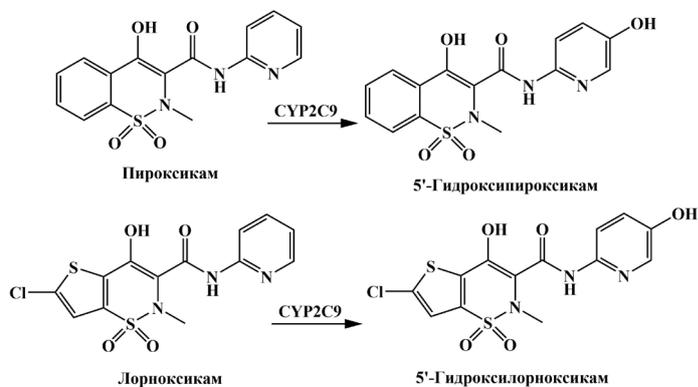
**Рисунок 5.** Реакции метаболизма имипрамина при участии CYP2C19, CYP1A2, CYP3A4 и CYP2D6. Адаптировано из [23].

ароматическому гидроксированию при участии CYP2D6 до соответствующего 2-гидрокси производного [23]. При изучении вольтамперных кривых имипрамина, дезипрамина и их соответствующих 2-гидроксиметаболитов с помощью стеклоглеродного электрода Коуата и соавт. отметили, что 2-гидрокси производные имеют меньшие потенциалы окисления, по сравнению с имипрамином и дезипрамином [62]. Как и в случае с миансеринном, авторы предлагают для анализа имипрамина, дезипрамина и их соответствующих 2-гидроксиметаболитов в плазме крови и моче хроматографическое разделение, однако различия в электрохимических свойствах этих лекарственных препаратов и их метаболитов могут быть использованы для совместного количественного определения. Поскольку имипрамин и дезипрамин могут быть использованы в качестве маркерных субстратов CYP2D6 при проведении ингибиторного анализа [63, 64], представляет интерес определение их 2-гидроксиметаболитов электрохимическими методами, основанными на различии электрохимических свойств продуктов и субстратов реакции.

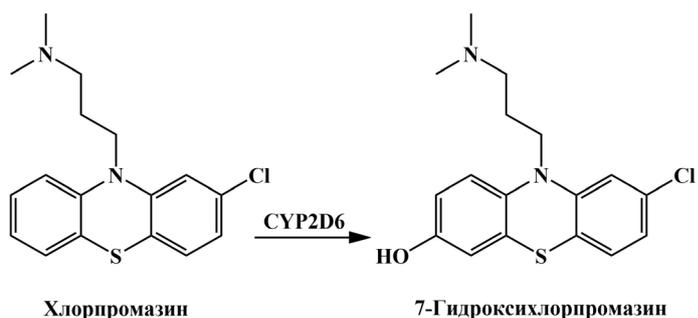
Нестероидный противовоспалительный препарат диклофенак подвергается преимущественно реакциям 4'-гидроксирования при участии цитохрома P450 2C9 (CYP2C9) и 5-гидроксирования при участии CYP3A4 [65] (рис. 6). Диклофенак имеет пик электрохимического окисления в области 0.5-0.7 В (отн. Ag/AgCl) [66-68]. Для 4'-гидроксидиклофенака методом циклической вольтамперометрии авторы 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 (pH 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 [69]. Поскольку диклофенак является маркерным субстратом CYP2C9, он наиболее часто используется для определения активности CYP2C9 [70], электрохимические системы определения метаболитов



**Рисунок 6.** Реакции метаболизма диклофенака при участии CYP2C9 и CYP3A4.



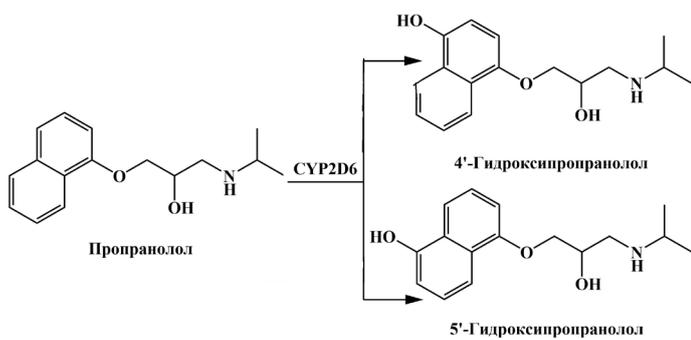
**Рисунок 7.** Реакции метаболизма пироксикама и лорноксикама при участии CYP2C9.



**Рисунок 8.** Реакция метаболизма хлорпромазина при участии CYP2D6.

диклофенака и его метаболитов могут использоваться в фармакологических исследованиях при скрининге ингибирующей активности лекарственных препаратов по отношению к CYP2C9.

Нестероидные противовоспалительные средства, принадлежащие к группе оксикамов, такие как лорноксикам, пироксикам, подвергаются ароматическому гидроксированию по пиридиновому радикалу под действием CYP2C9 с образованием соответствующих 5'-гидрокси производных (рис. 7) [13, 14]. Suwa и соавт., исследуя электрохимические свойства лорноксикама и его 5'-гидроксиметаболита методом гидродинамической

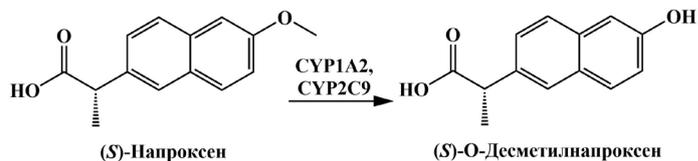


**Рисунок 9.** Реакции метаболизма пропранолола при участии CYP2D6.

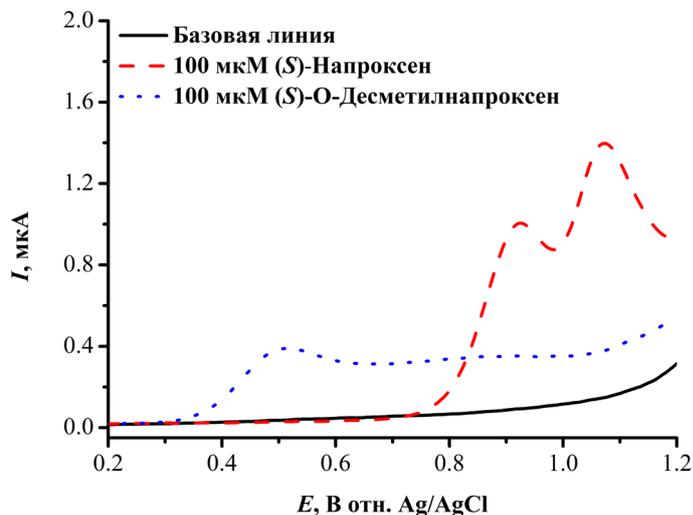
вольтамперометрии, показали отличие в электрохимических свойствах этих соединений, обусловленное наличием гидроксильной группы у 5'-гидроксиорноксикама [71]. Различия в электрохимических свойствах оксикамов и их 5'-гидроксилированных производных, образующихся при участии CYP2C9, позволяют сделать предположение, что активность данного фермента может быть исследована путем количественного электрохимического определения 5'-гидроксиметаболитов оксикамов. Однако стоит отметить, что пироксикам проявляет свойства субстратного ингибитора [14], что стоит учитывать при выборе данного субстрата для оценки активности CYP2C9.

Нейролептик хлорпромазин подвергается ароматическому гидрокселированию при участии CYP2D6 по 7 положению фенотиазинового фрагмента молекулы (рис. 8) [33]. Электрохимические свойства хлорпромазина, 7-гидроксихлорпромазина, а также 7,8-дигидроксихлорпромазина были исследованы в работе McCreery с помощью угольно-пастового электрода в цитрат-фосфатном буфере [72]. 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 гидрокселированию [73]. Можно предположить, что количественное определение 7-гидроксихлорпромазина, основанное на отличии его электрохимических свойств от электрохимических свойств хлорпромазина, обусловленного наличием гидроксильной группы в 7 положении, может быть использовано для оценки влияния других лекарственных препаратов на активность CYP2D6.

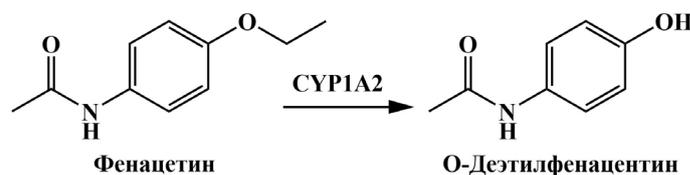
Препарат пропранолол, принадлежащий к группе  $\beta$ -блокаторов, метаболизируется под действием CYP2D6 до 4'- или 5'-гидроксипропранолола [31] (рис. 9). Электрохимические свойства пропранолола и 4'-гидроксипропранолола были исследованы с помощью стеклоуглеродного электрода в работе Varanowska и Koreg [74]. 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



**Рисунок 10.** Реакции метаболизма пропранолола при участии CYP2D6.



**Рисунок 11.** Квадратно-волновые вольтамперограммы 0.1 М калий-фосфатного буфера (pH 7.4), содержащего 0.05 М NaCl, 1% метанола (по объему) (—), 100 мкМ (S)-напроксена (---) или 100 мкМ (S)-O-десметилнапроксена (···). Частота сигнала 25 Гц.



**Рисунок 12.** Реакция метаболизма фенацетина при участии CYP1A2.

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 [75-77]. Для 4'-гидроксипропранолола первый пик окисления находился при 0.114 В, а на катодной ветви наблюдался восстановительный пик при 0.048 В. Это указывает на обратимость электрохимического процесса для этого метаболита пропранолола. При этом, 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.

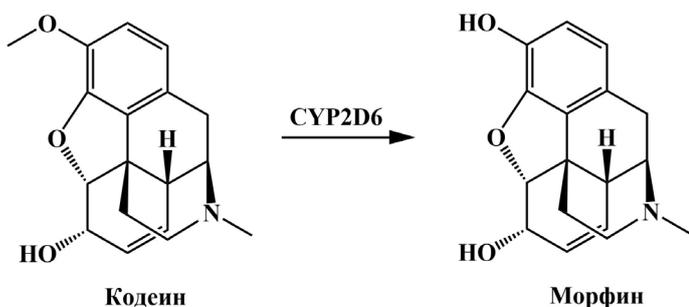


Рисунок 13. Реакция метаболизма кодеина при участии CYP2D6.

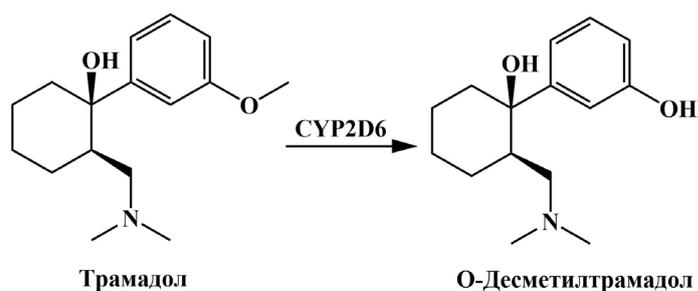


Рисунок 14. Реакция метаболизма трамадолa при участии CYP2D6.

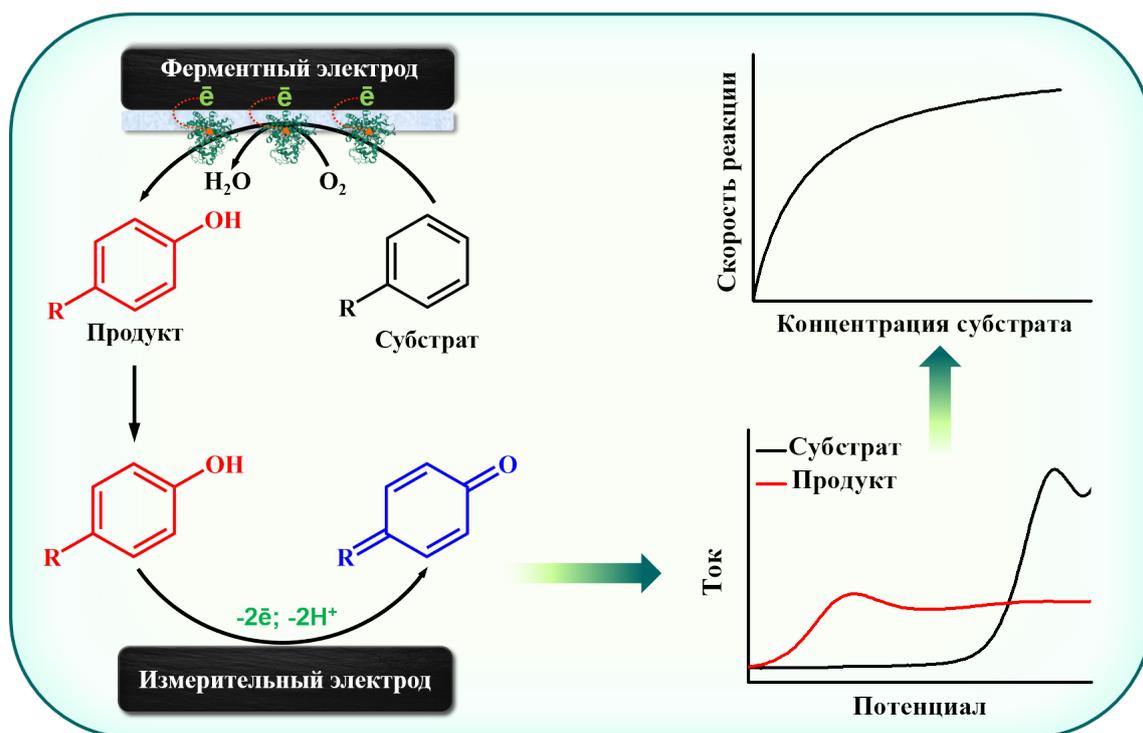


Рисунок 15. Принцип функционирования биэлектродных систем на основе иммобилизованных цитохромов P450 (ферментный электрод) и электрохимическим определением продукта ферментативной реакции (измерительный электрод).

## 2. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИЙ ДЕАЛКИЛИРОВАНИЯ

Реакции О-деалкилирования ароматических субстратов, катализируемые цитохромами P450, приводят к образованию соответствующих гидроксифенильных производных и альдегидов. Так, при участии CYP1A2 и CYP2C9 нестероидное противовоспалительное средство напроксен подвергается реакции О-деметилирования с образованием О-десметилнапроксена [41] (рис. 10). Пики электрохимического окисления (S)-О-десметилнапроксена, образующегося в результате О-деметилирования (S)-напроксена, находятся в области около 0.5 В (отн. Ag/AgCl), что соответствует окислению гидроксифенильной группы, и 0.8 В, что соответствует дальнейшему окислению метаболита; при этом пики окисления (S)-напроксена, соответствующие формированию катион-радикала и его дальнейшему окислению, расположены в области 0.9 В и 1.1 В (рис. 11). Таким образом, концентрация О-десметилнапроксена может оцениваться по характеристическому пику окисления в области 0.5 В при исследовании О-деметилазной активности CYP2C9.

Анальгетик и антипиретик фенацетин подвергается реакции О-деалкилирования при участии CYP1A2 с образованием О-деэтилфенацетина (ацетаминофена или парацетамола) [42] (рис. 12). По данным Yin и соавт., О-деэтилфенацетин окисляется при меньших потенциалах (пик окисления 0.42 В отн. насыщенного каломельного электрода) по сравнению с фенацетином (пик окисления 0.848 В), а также авторы показали возможность совместного определения этих соединений благодаря различиям в их электрохимических свойствах [78]. Это дает возможность предположить, что оценка активности CYP1A2 может проводиться электрохимическими методами по характеристическому пику окисления образующегося продукта О-деалкилирования фенацетина.

CYP2D6 принадлежит важная роль в метаболизме опиоидов [79]. Опиоидный наркотический анальгетик кодеин подвергается реакции О-деметилирования с образованием морфина, содержащего гидроксифенильную группу в 3 положении (рис. 13) [51]. 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 [80].

Трамадол подвергается СYP2D6-зависимому O-деметилированию с образованием O-десметилтрамадола (рис. 14) [53]. Возможность одновременного электрохимического определения трамадола и O-десметилтрамадола была показана в работе Munttinen и соавт. [81]. Используя покрытые нафтионом электроды из тетраэдрического аморфного углерода, авторы показали, что трамадол и O-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 O-десметилтрамадола.

Таким образом, O-деметилазная активность СYP2D6 может оцениваться путем электрохимического определения морфина, в случае использования в качестве субстрата кодеина, или O-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 определения последних как в биологических образцах (кровь или моча), так и в цитохром P450-содержащих системах с целью оценки фармакокинетики лекарственных препаратов и прогноза межлекарственных взаимодействий. При этом, в случае использования систем, в которых цитохром P450 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.

### 3. БИЭЛЕКТРОДНЫЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОВ P450

Использование электрохимических систем с иммобилизованным на электроде ферментом является современным подходом для определения активности цитохромов P450. При этом электрод служит источником электронов для восстановления иона железа гема и инициирования каталитической реакции; отсутствует необходимость использования коферментов-доноров электронов и белков электрон-транспортной цепи [82–84]. Регистрация каталитической активности в таких системах может осуществляться по изменению электрохимических параметров иммобилизованного фермента в присутствии субстрата. Однако вследствие неполного сопряжения каталитического цикла цитохрома P450 и образования активных форм кислорода для точного определения кинетических параметров требуется количественное определение продуктов реакций. В большинстве случаев для анализа продуктов цитохром P450-зависимых реакций с помощью классических методов энзимологии требуется их выделение, что ограничивает возможность высокопроизводительного анализа для решения задач фармакокинетики и фармакодинамики. В связи с этим перспективным с точки зрения удобства практического использования является совмещение электрохимических систем на основе ферментных электродов с электрохимическим количественным определением образующихся цитохром P450-зависимых реакций с помощью измерительных электродов.

Принцип функционирования таких биэлектродных систем проиллюстрирован на рисунке 15.

Такие электрохимические системы могут быть сконструированы на основе электродов, полученных методом трафаретной печати, что обеспечивает взаимозаменяемость электродов при проведении электрохимического анализа, миниатюризацию аналитического процесса (объем пробы, используемой для анализа образующихся метаболитов с помощью измерительных электродов 50–100 мкл).

Различия в электрохимических свойствах (S)-варфарина и его метаболита (S)-7-гидроксиварфарина, обусловленные наличием гидроксифенильной группы у последнего, позволили нам разработать биэлектродную систему для определения активности СYP2C9 на основе электродов, полученных методом трафаретной печати [85]. Один из электродов этой системы являлся модифицированным дидодецилдиметиламмония бромидом с иммобилизованным СYP2C9 (ферментный электрод). Электрохимическое восстановление иона железа гема этого фермента инициировало каталитическую реакцию по отношению к (S)-варфарину. Второй (немодифицированный) электрод выступал в роли измерительного для количественного определения образующегося продукта ферментативной реакции (S)-7-гидроксиварфарина по пику его электрохимического окисления методом квадратно-волновой вольтамперометрии. С помощью разработанной системы были определены параметры стационарной кинетики СYP2C9 по отношению к (S)-варфарину: максимальная скорость реакции ( $V_{\max}$ ) и константа Михаэлиса ( $K_M$ ) –  $0.1 \pm 0.002 \text{ мин}^{-1}$  и  $3.03 \pm 0.38 \text{ мкМ}$  соответственно. Полученные параметры согласуются с аналогичными параметрами, полученными с помощью реконструированной ферментной системы [86]. Разработанный подход перспективен для оценки межлекарственных взаимодействий с участием СYP2C9, которые могут возникать при назначении варфарина с другими лекарственными препаратами.

Одним из эффективных способов увеличения аналитической чувствительности электрохимического определения различных соединений и снижения предела определяемых концентраций является использование различных химических модификаторов измерительных электродов на основе углеродных наноматериалов [87]. Мы показали, что использование модифицированных углеродными нанотрубками электродов, служащих для определения 4'-гидроксидиклофенака, образующегося в процессе СYP2C9-зависимого электрокаталитического гидроксирования нестероидного противовоспалительного препарата диклофенака, позволяет увеличить аналитическую чувствительность примерно в 37 раз и уменьшить предел определяемых концентраций примерно в 1.4 раза, по сравнению с немодифицированными электродами [88]. С помощью разработанной биэлектродной системы на основе иммобилизованного на электроде СYP2C9 и количественного электрохимического определения 4'-гидроксидиклофенака с помощью модифицированных углеродными нанотрубками электродов были определены кинетические параметры этого фермента:  $V_{\max}$   $5.35 \pm 0.13 \text{ мин}^{-1}$ ,  $K_M$   $11.66 \pm 0.92 \text{ мкМ}$ . При этом активность СYP2C9 в электрохимической системе по отношению к 100 мкМ диклофенаку была определена как  $4.74 \pm 0.42 \text{ мин}^{-1}$ , что сопоставимо с полученной ранее активностью фермента в реконструированной системе по отношению к диклофенаку той же концентрации

( $4.25 \pm 1.66 \text{ мин}^{-1}$ ) [89]. На примере ингибитора CYP2C9 сульфafenазола была показана возможность использования разработанной биелектродной системы в фармакокинетических исследованиях при проведении ингибиторного анализа.

Эстрон и  $\beta$ -эстрадиол, содержащие гидроксифенильные группы, образуются в результате реакций ароматизации андрогенов андростендиона и тестостерона, катализируемых цитохромом P450 19A1 (CYP19A1) [90]. При значениях pH, близких к нейтральным, эстрогены (в отличие от андрогенов) способны подвергаться прямому электрохимическому окислению за счет наличия у них гидроксифенильной группы [91-95]. Для оценки активности CYP19A1 по отношению к андрогенам была разработана биелектродная система, в которой немодифицированные электроды использовались для количественного определения эстрогенов по пику их электрохимического окисления [96]. С помощью разработанной системы были определены значения  $V_{\text{max}}$  ароматизации андростендиона и тестостерона под действием CYP19A1 в электрохимической системе, которые составили  $0.86 \pm 0.12 \text{ с}^{-1}$  и  $0.17 \pm 0.02 \text{ с}^{-1}$  соответственно, тогда как значения  $K_M$  составили  $4.2 \pm 1.5 \text{ мкМ}$  и  $3.8 \pm 1.3 \text{ мкМ}$  соответственно. Кроме того, показана применимость системы для проведения ингибиторного анализа на примере экземестана, применяющегося в клинической практике для лечения рака молочной железы, основным действием которого является механизм-активируемое ингибирование CYP19A1.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Электроаналитические методы высокочувствительны и удобны для использования в биохимическом анализе. 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 этом при условии неперекрывающихся потенциалов электроокисления не требуются дополнительные стадии разделения субстратов, продуктов и ингибиторов в случае проведения ингибиторного анализа. Совмещение электрохимических систем на основе иммобилизованных на электроде клинически значимых цитохромов P450 с электрохимическим количественным определением образующихся метаболитов лекарственных препаратов 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 анализа активности цитохромов P450.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не связана с исследованиями, в которых в качестве объекта выступают люди или животные.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-75-00048, <https://rscf.ru/project/21-75-00048/>

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Manikandan, P., Nagini, S. (2018) Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review. *Curr. Drug Targets*, **19**(1), 38-54. DOI: 10.2174/1389450118666170125144557
2. Lynch, T., Price, A. (2007) The effect of cytochrome p450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am. Fam. Physician*, **76**(3), 391-396.
3. Baston, E., Leroux, F.R. (2007) Inhibitors of steroidal cytochrome p450 enzymes as targets for drug development. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **2**(1), 31-58. DOI: 10.2174/157489207779561453
4. Hrycaj, E.G., Bandiera, S.M. (2015) Monooxygenase, peroxidase and peroxxygenase properties and reaction mechanisms of cytochrome p450 enzymes. in monooxygenase, peroxidase and peroxxygenase properties and mechanisms of cytochrome P450 (E. Hrycaj and S. Bandiera eds). Springer, Cham, pp. 1-61. DOI: 10.1007/978-3-319-16009-2\_1
5. Zukiswa, J., Sandrine, L., Frederic N. (2018) Cardiovascular benefits of dietary melatonin: a myth or a reality? *Frontiers in Physiology*, **9**, 528. DOI: 10.3389/fphys.2018.00528
6. Protti, M., Mandrioli, R., Marasca, C., Cavalli, A., Serretti, A., Mercolini, L. (2020) New-generation, non-SSRI antidepressants: Drug-drug interactions and therapeutic drug monitoring. Part 2: NaSSAs, NRIs, SNDRI, MASSAs, NDRIs, and others. *Med. Res. Rev.*, **40**, 1794-1832. DOI: 10.1002/med.21671
7. Cheng, Z.N., Shu, Y., Liu, Z.Q., Wang, L.S., Ou-Yang, D.S., Zhou, H.H. (2001) Role of cytochrome P450 in estradiol metabolism in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.*, **22**(2), 148-154.
8. Ogburn, E.T., Jones, D.R., Masters, A.R., Xu, C., Guo, Y., Desta, Z. (2010) 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 Metabolism and Disposition*, **38**(7), 1218-1229. DOI: 10.1124/dmd.109.031393
9. Restrepo, J.G., Garcia-Martin, E., Martinez, C., Agundez, J.A.G. (2009) Polymorphic drug metabolism in anaesthesia. *Current Drug Metabolism*, **10**(3), 236-246. DOI: 10.2174/138920009787846305
10. Baldwin, S.J., Clarke, S.E., Chenery, R.J. (1999) Characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in the in vitro metabolism of rosiglitazone. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **48**, 424-432. DOI: 10.1046/j.1365-2125.1999.00030.x
11. Ufer, M. (2005) Comparative Pharmacokinetics of Vitamin K Antagonists. *Clin. Pharmacokinet.*, **44**, 1227-1246. DOI: 10.2165/00003088-200544120-00003
12. Bort, R., Macé, K., Boobis, A., Gómez-Lechón, M.-J., Pfeijfer, A., Castell, J. (1999) Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways. *Biochemical Pharmacology*, **58**(5), 787-796. DOI: 10.1016/S0006-2952(99)00167-7
13. Kohl, C., Steinkellner, M. (2000) Prediction of pharmacokinetic drug/drug interactions from In vitro data: interactions of the nonsteroidal anti-inflammatory drug lornoxicam with oral anticoagulants. *Drug Metab. Dispos.*, **28**(2), 161-168.
14. Tracy, T.S., Hutzler, J.M., Haining, R.L., Rettie, A.E., Hummel, M.A., Dickmann, L.J. (2002) Polymorphic variants (CYP2C9\*3 and CYP2C9\*5) and the F114L Active site mutation of CYP2C9: effect on atypical kinetic metabolism profiles. *Drug Metab. Dispos.*, **30**(4), 385-390. DOI: 10.1124/dmd.30.4.385
15. Yamanaka, H., Nakajima, M., Hara, Y., Katoh, M., Tachibana, O., Yamashita, J., Yokoi, T. (2005) 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.*, **20**(2), 135-143. DOI: 10.2133/dmpk.20.135
16. Vogl, S., Lutz, R.W., Schönfelder, G., Lutz, W.K. (2015) CYP2C9 Genotype vs. Metabolic Phenotype for Individual Drug Dosing—A Correlation Analysis Using Flurbiprofen as Probe Drug. *PLOS ONE*, **10**(3), e0120403. DOI: 10.1371/journal.pone.0120403
17. Piatkov, I., Rochester, C., Jones, T., Boyages, S. (2010) Warfarin Toxicity and Individual Variability—Clinical Case. *Toxins*, **2**(11), 2584-2592. DOI: 10.3390/toxins2112584
18. Miura, M., Tada, H., Yasui-Furukori, N., Uno, T., Sugawara, K., Tateishi, T., Suzuki, T. (2004) Pharmacokinetic differences between the enantiomers of lansoprazole and its metabolite, 5-hydroxylansoprazole, in relation to CYP2C19 genotypes. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **60**, 623-628.

DOI: 10.1007/s00228-004-0809-1

19. Wienkers, L.C., Wurden, C.J., Storch, E., Kunz, K.L., Rettie, A.E., Trager, W.F. (1996) Formation of (R)-8-hydroxywarfarin in human liver microsomes. A new metabolic marker for the (S)-mephenytoin hydroxylase, P4502C19. *Drug Metab. Dispos.*, **24**(5), 610-614.
20. Klaassen, T., Jetter, A., Tomalik-Scharte, D., Kasel, D., Kirchheiner, J., Jaehde, U., Fuhr, U. (2008) Assessment of urinary mephenytoin metrics to phenotype for CYP2C19 and CYP2B6 activity. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **64**, 387-398. DOI: 10.1007/s00228-007-0416-z
21. Ebner, T., Eichelbaum, M. (1993) The metabolism of aprindine in relation to the sparteine/debrisoquine polymorphism. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **35**, 426-430. DOI: 10.1111/j.1365-2125.1993.tb04161.x
22. Dinh, J.C., Pearce, R.E., Van Haandel, L., Gaedigk, A., Leeder, J.S. (2016) Characterization of atomoxetine biotransformation. *Drug Metabolism and Disposition*, **44**(7), 1070-1079. DOI: 10.1124/dmd.116.069518
23. Nguyen, H.Q., Callegari, E., Obach, R.S. (2016) 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.*, **44**(10), 1569-1578. DOI: 10.1124/dmd.116.071639
24. Lantz, R.J., Gillespie, D.A., Rash, T.J., Kuo, F., Skinner, M., Kuan, H-Y., Knadler, M.P. (2003) Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of duloxetine in healthy human subjects. *Drug Metabolism and Disposition*, **31**(9), 1142-1150. DOI: 10.1124/dmd.31.9.1142
25. Wang, Z., Wang, L., Xu, R., Zhan, Y., Huang, C., Dai, D., Cai, J., Hu, G. (2016) Role of cytochrome P450 2D6 genetic polymorphism in carvedilol hydroxylation in vitro. *Drug Design, Development and Therapy*, **10**, 1909-1916. DOI: 10.2147/DDDT.S106175
26. Bakken, G.V., Rudberg, I., Christensen, H., Molden, E., Refsum, H., Hermann, M. (2009) Metabolism of quetiapine by CYP3A4 and CYP3A5 in presence or absence of cytochrome B<sub>5</sub>. *Drug Metabolism and Disposition*, **37**(2), 254-258. DOI: 10.1124/dmd.108.023291
27. Funae, Y., Kishimoto, W., Cho, T., Niwa, T., Hiroi, T. (2003) CYP2D in the brain. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, **18**(6), 337-349. DOI: 10.2133/dmpk.18.337
28. Okubo, M., Murayama, N., Miura, J., Chiba, Y., Yamazaki, H. (2015) Effects of cytochrome P450 2D6 and 3A5 genotypes and possible coadministered medicines on the metabolic clearance of antidepressant mirtazapine in Japanese patients. *Biochemical Pharmacology*, **93**(1), 104-109. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.11.011
29. Katsunori, N., Tsuyoshi, Y., Kazuaki, I., Noriaki, S., Noriko, O., Toshiyuki, K., Tetsuya, K. (1996) CYP2D6 is the principal cytochrome P450 responsible for metabolism of the histamine H<sub>1</sub> antagonist promethazine in human liver microsomes. *Pharmacogenetics*, **6**(5), 449-457. DOI: 10.1097/00008571-199610000-00009
30. Afshar, M., Rouini, M. (2004) A Rapid HPLC Assay for the simultaneous determination of propafenone and its major metabolites in human serum. *Analytical Sciences*, **20**(9), 1307-1311. DOI: 10.2116/analsci.20.1307
31. Uptagrove, A.L., Nelson, W.L. (2001) Importance of amine pKa and distribution coefficient in the metabolism of fluorinated propranolol derivatives. Preparation, identification of metabolite regioisomers, and metabolism by CYP2D6. *Drug Metab. Dispos.*, **29**(11), 1377-1388.
32. Lyon, E., Gastier Foster, J., Palomaki, G.E., Pratt, V.M., Reynolds, K., Sabato, M.F., Scott S.A., Vitazka P. (2012) Working group of the Molecular Genetics Subcommittee on behalf of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee. Laboratory testing of CYP2D6 alleles in relation to tamoxifen therapy. *Genet. Med.*, **14**(12), 990-1000. DOI: 10.1038/gim.2012
33. Beloti, L.G.M., Miranda, L.F.C., Queiroz, M.E.C. (2019) 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*, **24**(2), 310. DOI: 10.3390/molecules24020310
34. Mürdter, T.E., Kerb, R., Turpeinen, M., Schroth, W., Ganchev, B., Böhmer, G.M., Igel, S., Schaeffeler, E., Zanger, U., Brauch, H., Schwab, M. (2012) Genetic polymorphism of cytochrome P450 2D6 determines oestrogen receptor activity of the major infertility drug clomiphene via its active metabolites. *Human Molecular Genetics*, **21**(5), 1145-1154. DOI: 10.1093/hmg/ddr543
35. Yamamura, Y., Koyama, N., Umehara, K. (2015) Comprehensive kinetic analysis and influence of reaction components for chlorzoxazone 6-hydroxylation in human liver microsomes with CYP antibodies. *Xenobiotica*, **45**(4), 353-360. DOI: 10.3109/00498254.2014.985760
36. Liu, A., Wu, Q., Guo, J., Ares, I., Rodriguez, J.-L., Martínez-Larrañaga, M.-R., Yuan, Z., Anadón, A., Wang, X., Martínez, M.-A. (2019) Statins: adverse reactions, oxidative stress and metabolic interactions. *Pharmacology & Therapeutics*, **195**, 54-84. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.10.004
37. Masubuchi, Y., Ose, A., Horie, T. (2002) Diclofenac-induced inactivation of CYP3A4 and its stimulation by quinidine. *Drug Metab. Dispos.*, **30**(10), 1143-1148. DOI: 10.1124/dmd.30.10.1143
38. Fan-Havard, P., Liu, Z., Chou, M., Ling, Y., Barrail-Tran, A., Haas, D.W., Taburet, A.M., ANRS12154 Study Group (2013) Pharmacokinetics of phase I nevirapine metabolites following a single dose and at steady state. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**(5), 2154-2160. DOI: 10.1128/AAC.02294-12
39. Wen, B., Ma, L., Rodrigues, A.D., Zhu, M. (2008) Detection of novel reactive metabolites of trazodone: evidence for CYP2D6-mediated bioactivation of m-chlorophenylpiperazine. *Drug Metabolism and Disposition*, **36**(5), 841-850. DOI: 10.1124/dmd.107.019471
40. Zhang, H., Cui, D., Wang, B., Han, Y.-H., Balimane, P., Yang, Z., Sinz, M., Rodrigues, A.D. (2007) Pharmacokinetic drug interactions involving 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Clin. Pharmacokinet.*, **46**, 133-157. DOI: 10.2165/00003088-200746020-00003
41. Miners, J.O., Coulter, S., Tukey, R.H., Veronese, M.E., Birkett, D.J. (1996) Cytochromes P450, 1A2, and 2C9 are responsible for the human hepatic O-demethylation of R- and S-naproxen. *Biochemical Pharmacology*, **51**(8), 1003-1008. DOI: 10.1016/0006-2952(96)85085-4
42. Taxai, N., Prasad, K., Bharatam, P. (2012) Mechanistic insights into the bioactivation of phenacetin to reactive metabolites: A DFT study. *Comput. Theor. Chem.*, **1007**, 48-56. DOI: 10.1016/j.comptc.2012.11.018
43. Nakajima, M., Inoue, T., Shimada, N., Tokudome, S., Yamamoto, T., Kuroiwa, Y. (1998) Cytochrome P450 2C9 catalyzes indomethacin O-demethylation in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, **26**(3), 261-266.
44. Pan, P.P., Weng, Q.H., Zhou, C.J., Wei, Y.L., Wang, L., Dai, D.P., Cai, J.P., Hu, G.X. (2016) The role of CYP2C9 genetic polymorphism in carvedilol O-demethylation in vitro. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **41**(1), 79-86. DOI: 10.1007/s13318-014-0245-2
45. Magalhães, P., Alves, G., Llerena, A., Falcão, A. (2014) Venlafaxine pharmacokinetics focused on drug metabolism and potential biomarkers. *Drug Metabol. Drug Interact.*, **29**(3), 129-141. DOI: 10.1515/dm-di-2013-0053
46. Bachus, R., Bickel, U., Thomsen, T., Roots, I., Kewitz, H. (1999) The O-demethylation of the antiedementia drug galanthamine is catalysed by cytochrome P450 2D6. *Pharmacogenetics*, **9**(6), 661-668.
47. Fang, P., Zheng, X., He, J., Ge, H., Tang, P., Cai, J., Hu, G. (2017) Functional characterization of wild-type and 24 CYP2D6 allelic variants on gefitinib metabolism in vitro. *Drug Des. Devel. Ther.*, **11**, 1283-1290. DOI: 10.2147/DDDT.S133814
48. Barakat, N.H., Atayee, R.S., Best, B.M., Pesce, A.J. (2012) Relationship between the concentration of hydrocodone and its conversion to hydromorphone in chronic pain patients using urinary excretion data. *J. Anal. Toxicol.*, **36**(4), 257-264. DOI: 10.1093/jat/bks019
49. Kim, J., Lim, Y.R., Han, S., Han, J.S., Chun, Y.J., Yun, C.H., Lee, C.H., Kim, D. (2013) Functional influence of human CYP2D6 allelic variations: P34S, E418K, S486T, and R296C. *Arch. Pharm. Res.*, **36**(12), 1500-1506. DOI: 10.1007/s12272-013-0212-5
50. Mikus, G., Weiss, J. (2005) Influence of CYP2D6 genetics on opioid kinetics, metabolism and response. *Current Pharmacogenomics*, **3**(1), 43-52. DOI: 10.2174/1570160053175018
51. 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. (2009) The pharmacokinetics of codeine and its metabolites in Blacks with sickle cell disease. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **65**(7), 651-658. DOI: 10.1007/s00228-009-0646-3
52. 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. (2010) Genetic polymorphisms and drug interactions modulating CYP2D6 and CYP3A activities have a major effect on oxycodone analgesic efficacy and safety. *Br. J. Pharmacol.*, **160**(4), 919-930. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00709.x
53. Perez Jimenez, T.E., Mealey, K.L., Grubb, T.L., Greene, S.A., Court, M.H. (2016) 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.*, **44**(12), 1963-1972. DOI: 10.1124/dmd.116.071902
54. Doki, K., Sekiguchi, Y., Kuga, K., Aonuma, K., Homma, M. (2015) Serum flecainide S/R ratio reflects the CYP2D6 genotype and changes in CYP2D6 activity. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **30**(4), 257-262. DOI: 10.1016/j.dmpk.2015.04.001
55. Matsumoto, S., Hirama, T., Matsubara, T., Nagata, K., Yamazoe, Y. (2002) Involvement of CYP2J2 on the intestinal first-pass metabolism of antihistamine drug, astemizole. *Drug Metab. Dispos.*, **30**(11), 1240-1245. DOI: 10.1124/dmd.30.11.1240
56. Wilkinson, D.G. (1999) The pharmacology of donepezil: a new treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin. Pharmacother.*, **1**(1), 121-135. DOI: 10.1517/14656566.1.1.121
57. Zanger, U.M., Schwab, M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.*, **138**(1), 103-141. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007
58. Jurva, U., Wikström, H.V., Weidolf, L., Bruins, A.P. (2003) Comparison between electrochemistry/mass spectrometry and cytochrome P450 catalyzed oxidation reactions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**(8), 800-810. DOI: 10.1002/rcm.978
59. Nouri-Nigjeh, E., Bischoff, R., Bruins, A.P., Permentier, H.P. (2011) Electrochemistry in the mimicry of oxidative drug metabolism by cytochrome P450s. *Curr. Drug Metab.*, **12**(4), 359-371. DOI: 10.2174/138920011795202929
60. Kaminsky, L.S., Zhang, Z.Y. (1997) Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol. Ther.*, **73**(1), 67-74. DOI: 10.1016/s0163-7258(96)00140-4
61. Suckow, R.F., Cooper, T.B., Quitkin, F.M., Stewart, J.W. (1982)

- Determination of mianserin and metabolites in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Pharm. Sci.*, **71**(8), 889-892. DOI: 10.1002/jps.2600710812
62. *Koyama, E., Kikuchi, Y., Echizen, H., Chiba, K., Ishizaki, T.* (1993) 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.*, **15**(3), 224-235. DOI: 10.1097/00007691-199306000-00009
63. *Bogni, A., Monshouwer, M., Moscone, A., Hidestrand, M., Ingelman-Sundberg, M., Hartung, T., Coecke, S.* (2005) Substrate specific metabolism by polymorphic cytochrome P450 2D6 alleles. *Toxicol. In Vitro*, **19**(5), 621-629. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.04.001
64. *DeVane, C.L.* (2006) Antidepressant-drug interactions are potentially but rarely clinically significant. *Neuropsychopharmacology*, **31**(8), 1594-1604; discussion 1614-1615. DOI: 10.1038/sj.npp.1301069
65. *Tang, W.* (2003) The metabolism of diclofenac - enzymology and toxicology perspectives. *Curr. Drug Metab.*, **4**(4), 319-329. DOI: 10.2174/1389200033489398
66. *Goyal, R.N., Chatterjee, S., Agrawal, B.* (2010) Electrochemical investigations of diclofenac at edge plane pyrolytic graphite electrode and its determination in human urine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **145**(2), 743-748. DOI: 10.1016/j.snb.2010.01.038
67. *Cid-Cerón, M.M., Guzmán-Hernández, D.S., Ramírez-Silva, M.T., Galano, A., Romero-Romo, M., Palomar-Pardavé, M.* (2016) New insights on the kinetics and mechanism of the electrochemical oxidation of diclofenac in neutral aqueous medium. *Electrochimica Acta*, **199**, 92-98. DOI: 10.1016/j.electacta.2016.03.094
68. *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.* (2017) New insights on diclofenac electrochemistry using graphite as working electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **794**, 182-188. DOI: 10.1016/j.jelechem.2017.03.050
69. *Madsen, K.G., Skonberg, C., Jurva, U., Cornett, C., Hansen, S.H., Johansen, T.N., Olsen, J.* (2008) Bioactivation of diclofenac in vitro and in vivo: correlation to electrochemical studies. *Chem. Res. Toxicol.*, **21**(5), 1107-1119. DOI: 10.1021/tx700419d
70. *Zi, J., Liu, D., Ma, P., Huang, H., Zhu, J., Wei, D., Yang, J., Chen, C.* (2010) Effects of CYP2C9\*3 and CYP2C9\*13 on Diclofenac metabolism and inhibition-based drug-drug interactions. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **25**(4), 343-350. DOI: 10.2133/dmpk.dmpk-10-rg-009
71. *Suwa, T., Urano, H., Shinohara, Y., Kokatsu, J.* (1993) Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of lornoxicam and its 5'-hydroxy metabolite in human plasma using electrochemical detection. *J. Chromatogr.*, **617**(1), 105-110. DOI: 10.1016/0378-4347(93)80427-6
72. *McCreery, R.L.* (1977) Oxidative reactions of hydroxylated chlorpromazine metabolites. *J. Pharm. Sci.*, **66**(3), 357-361. DOI: 10.1002/jps.2600660313
73. *Neptune, M., McCreery, R.L.* (1978) Chemical and electrochemical oxidation of 7-hydroxychlorpromazine. *J. Med. Chem.*, **21**(4), 362-368. DOI: 10.1021/jm00202a010
74. *Baranowska, I., Koper, M.* (2011) Electrochemical behavior of Propranolol and its major metabolites, 4'-hydroxypropranolol and 2'-hydroxypropranolol Sulfate, on glassy carbon electrode. *J. Braz. Chem. Soc.*, **22**(8), 1601-1609. DOI: 10.1590/S0103-50532011000800025
75. *Santos, S.X.d., Cavalheiro, É.T.G., Brett, C.M.A.* (2010) Analytical potentialities of carbon nanotube/silicone rubber composite electrodes: determination of propranolol. *Electroanalysis*, **22**, 2776-2783. DOI: 10.1002/elan.201000262
76. *Santos, S.X.d., Cavalheiro, É.T.G., Brett, C.M.A.* (2011) The potentialities of using a graphite-silicone rubber composite electrode in the determination of propranolol. *Analytical Letters*, **44**(5), 850-862. DOI: 10.1080/00032711003789991
77. *Stoian, I.-A., Iacob, B.-C., Ramalho, J.P.P., Marian, I.O., Chiş, V., Bodoki, E., Oprean, R.* (2019) A chiral electrochemical system based on l-cysteine modified gold nanoparticles for propranolol enantiodiscrimination: Electroanalysis and computational modelling. *Electrochimica Acta*, **326**, 134961. DOI: 10.1016/j.electacta.2019.134961
78. *Yin, H., Meng, X., Xu, Z., Chen, L., Ai S.* (2012) Electrochemical behavior of phenacetin on CdSe microspheres modified glassy carbon electrode and its simultaneous determination with paracetamol and 4-aminophenol. *Analytical Methods*, **4**, 1445-1451. DOI: 10.1039/C2AY05912F
79. *Smith, H.S.* (2009) Opioid metabolism. *Mayo Clin. Proc.*, **84**(7), 613-624. DOI: 10.4065/84.7.613
80. *Wester, N., Mynttinen, E., Etula, J., Lilius, T., Kalso, E., Kauppinen, E.I., Laurila, T., Koskinen, J.* (2019) 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*, **4**(18), 17726-17734. DOI: 10.1021/acsomega.9b02147
81. *Mynttinen, E., Wester, N., Lilius, T., Kalso, E., Koskinen, J., Laurila, T.* (2019) Simultaneous electrochemical detection of tramadol and O-desmethyltramadol with Nafion-coated tetrahedral amorphous carbon electrode. *Electrochimica Acta*, **295**, 347-353. DOI: 10.1016/j.electacta.2018.10.148
82. *Sadeghi, S.J., Fantuzzi, A., Gilardi, G.* (2011) Breakthrough in P450 bioelectrochemistry and future perspectives. *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**(1), 237-248. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.07.010
83. *Schneider, E., Clark, D.S.* (2013) Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, **39**(1), 1-13. DOI: 10.1016/j.bios.2012.05.043
84. *Shumyantseva, V.V., Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Bulko, T.V., Archakov, A.I.* (2018) From electrochemistry to enzyme kinetics of cytochrome P450. *Biosens. Bioelectron.*, **121**, 192-204. DOI: 10.1016/j.bios.2018.08.040
85. *Kuzikov, A.V., Filippova, T.A., Masamrekh, R.A., Shumyantseva, V.V.* (2022) Electrochemical determination of (S)-7-hydroxywarfarin for analysis of CYP2C9 catalytic activity. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **904**, 115937. DOI: 10.1016/j.jelechem.2021.115937
86. *Mosher, C.M., Hummel, M.A., Tracy, T.S., Rettie, A.E.* (2008) Functional analysis of phenylalanine residues in the active site of cytochrome P450 2C9. *Biochemistry*, **47**(45), 11725-11734. DOI: 10.1021/bi801231m
87. *Michalkiewicz, S., Skorupa, A., Jakubczyk, M.* (2021) Carbon Materials in Electroanalysis of Preservatives: A Review. *Materials (Basel)*, **14**(24), 7630. DOI: 10.3390/ma14247630
88. *Kuzikov, A.V., Filippova, T.A., Masamrekh, R.A., Shumyantseva, V.V.* (2022) Electroanalysis of 4'-Hydroxydiclofenac for CYP2C9 Enzymatic Assay. *Electrocatalysis*, **13**, 630-640. DOI: 10.1007/s12678-022-00753-3
89. *Haidukevich, I.V., Sushko, T.A., Tumilovich, A.M., Grabovec, I.P., Usanov, S.A., Gilep, A.A.* (2018) Different inhibitory effects of azole-containing drugs and pesticides on CYP2C9 polymorphic forms: An in vitro study. *Toxicology in Vitro*, **50**, 249-256. DOI: 10.1016/j.tiv.2018.04.002
90. *Sohl, C.D., Guengerich, F.P.* (2010) Kinetic analysis of the three-step steroid aromatase reaction of human cytochrome P450 19A1. *J. Biol. Chem.*, **285**(23), 17734-17743. DOI: 10.1074/jbc.M110.123711
91. *Zhu, Y., Liu, X., Jia, J.* (2015) Electrochemical detection of natural estrogens using a graphene/ordered mesoporous carbon modified carbon paste electrode. *Analytical Methods*, **7**, 8626-8631. DOI: 10.1039/C5AY01833A
92. *Moraes, F.C., Rossi, B., Donatoni, M.C., de Oliveira K.T., Pereira E.C.* (2015) Sensitive determination of 17 $\beta$ -estradiol in river water using a graphene based electrochemical sensor. *Anal. Chim. Acta*, **881**, 37-43. DOI: 10.1016/j.aca.2015.04.043
93. *Lin, X., Li, Y.* (2006) A sensitive determination of estrogens with a Pt nano-clusters/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Biosens. Bioelectron.*, **22**(2), 253-259. DOI: 10.1016/j.bios.2006.01.005
94. *Hu, S., Wu, K., Yi, H., Cui, D.* (2002) Voltammetric behavior and determination of estrogens at Nafion-modified glassy carbon electrode in the presence of cetyltrimethylammonium bromide. *Analitica Chimica Acta*, **464**(2), 209-216. DOI: 10.1016/S0003-2670(02)00496-8
95. *Musa, A.M., Kiely, J., Luxton, R., Honeychurch, K.C.* (2021) Recent progress in screen-printed electrochemical sensors and biosensors for the detection of estrogens. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **139**, 116254. DOI: 10.1016/j.trac.2021.116254
96. *Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Filippova, T.A., Haurychenka, Y.I., Gilep, A.A., Shkel, T.V., Strushkevich, N.V., Usanov, S.A., Shumyantseva, V.V.* (2020) Electrochemical oxidation of estrogens as a method for CYP19A1 (aromatase) electrocatalytic activity determination. *Electrochimica Acta*, **333**, 135539. DOI: 10.1016/j.electacta.2019.135539

Поступила: 08.07.2022  
 После доработки: 30.09.2022  
 Принята к публикации: 28.10.2022

## ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF METABOLITES AS A METHOD FOR CYTOCHROMES P450 ACTIVITY DETERMINATION

*A.V. Kuzikov<sup>1,2</sup>, R.A. Masamrekh<sup>1,2</sup>, T.A. Filippova<sup>1,2</sup>, V.V. Shumyantseva<sup>1,2\*</sup>*

<sup>1</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovityanova str. Moscow, 117997 Russia;

\*e-mail: v\_shumyantseva@mail.ru

<sup>2</sup>Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia

The review deals with the electrochemical methods for determination of metabolites of cytochromes P450 catalyzed reactions. We have focused on the electrochemical determination of metabolites of drugs and some endogenous compounds. We have reviewed bielelectrode systems for determination of cytochrome P450 activity, where one electrode serves as a matrix for enzyme immobilization and a source of electrons for heme iron ion reduction and initialization of the catalytic reaction towards a substrate and the second one is being used for quantification of the products formed by their electrochemical oxidation. Such systems allow one to elude additional steps of separation of reaction substrates and products. The review also includes discussion of the ways to increase the analytical sensitivity and decrease the limit of detection of the investigated metabolites by chemical modification of electrodes. We demonstrate the possibilities of these systems for cytochrome P450 kinetics analysis and the perspectives of their further improvement, such as increasing the sensitivity of metabolite electrochemical determination by modern electrode modifiers, including carbon-based, and construction of devices for automatic monitoring of the products.

**Key words:** cytochromes P450; drugs; metabolites; electrochemistry

### FUNDING

The research was carried out at the expense of the Russian Science Foundation grant No. 21-75-00048. <https://rscf.ru/project/21-75-00048/>.

Received: 08.07.2022, revised: 30.09.2022, accepted: 28.10.2022













