

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ,  
СОДЕРЖАЩИХ ЦИТОХРОМ P450 3A4

П. И. Королева, В. В. Шумянцева\*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; \*e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Описаны разработанные авторами подходы для повышения эффективности электроферментативных реакций, катализируемых цитохромом P450 3A4. Проведен сравнительный анализ цитохром P450 3A4-систем (i) при образовании функциональных комплексов гемопротеин-флавиновые нуклеотиды как низкомолекулярные модели NADPH-зависимой цитохром P450 редуктазы, (ii) при образовании продуктивного фермент-субстратного комплекса до стадии получения электронов, поступающих с электрода, (iii) при включении фермента в нанопоры различной природы на электроде (2D-3D переход). Рассмотрены результаты по электрохимическому восстановлению бактосом как функционально активных моделей микросомальной монооксигеназной системы. Для сравнения результатов, полученных для разных моделей, были исследованы электрохимические и электрокаталитические параметры цитохрома P450 3A4 и маркерного субстрата эритромицина.

**Ключевые слова:** электроанализ; лекарственные препараты; цитохром P450 3A4; биореактор; ферментативный катализ; электроферментативные системы; флавиновые нуклеотиды; бактосомы

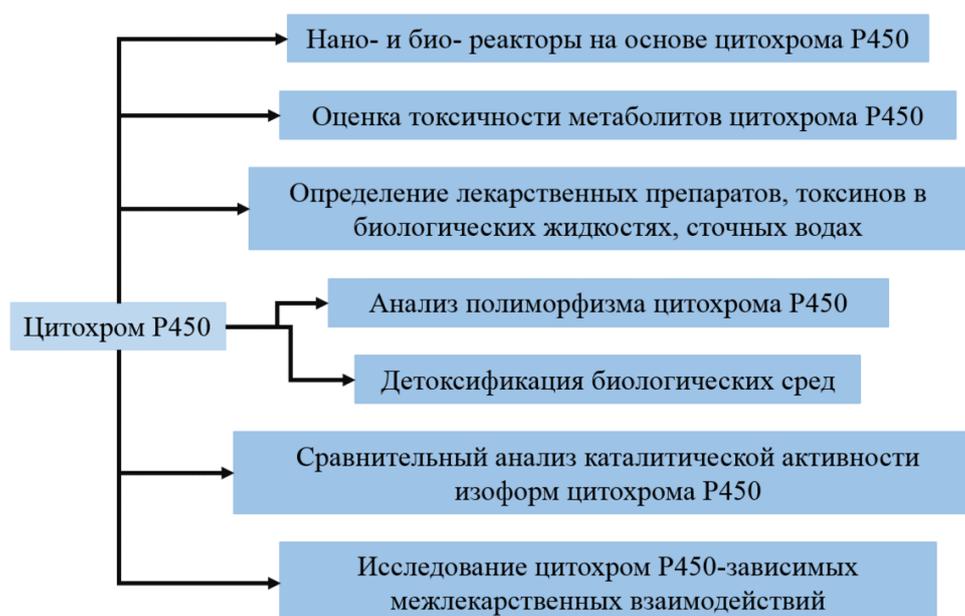
**DOI:** 10.18097/BMCRM00210

## ВВЕДЕНИЕ

Цитохромы P450 (CYP) – обширное семейство ферментов, относящихся к классу оксидоредуктаз и катализирующих монооксигеназные реакции (рис. 1). Основной функцией CYP является метаболизм эндогенных и экзогенных соединений. Лекарственные препараты, токсические соединения, компоненты пищевых добавок или же продуктов питания при попадании в организм подвергаются I фазе биотрансформации благодаря реакциям, катализируемым цитохромами P450. С этой точки зрения цитохромы P450 являются аналогами антител, нейтрализующих низкомолекулярные токсичные соединения. Реакции, характерные для CYP, являются по механизму действия бисубстратными, так как в каталитическом акте принимает участие органический субстрат и молекулярный кислород. CYP катализируют различные типы химических реакций: гидроксирование насыщенного атома углерода, O-, S-, N-деалкилирование, эпоксирирование, сульфоокисление, дезаминирование, дегалогенирование [1]. Такие реакции приводят к образованию более полярного, по сравнению с субстратом, продукта реакции, способствуя протеканию реакций II фазы биотрансформации с участием ферментов «второй линии защиты», таких как N-ацетилтрансферазы, глутатион-S-трансферазы, глюкуронозилтрансферазы, эпоксидгидролазы и метилтрансферазы. Окисление лекарственного препарата, осуществляемое при участии изоферментов цитохрома P450, может приводить к снижению, инактивации или изменению фармакологических свойств лекарственного препарата, или наоборот, повышать его фармакологические свойства.

CYP 3A4 (CYP3A4) участвует в метаболизме примерно 50% всех лекарственных препаратов и ряда эндогенных биологически активных соединений, к числу которых относятся, например, стероидные гормоны. CYP являются потенциальными биореакторами для получения соединений, которые сложно получить химическим синтезом вследствие стереонаправленности реакций. Одним из примеров применения CYP в качестве биореакторов на промышленном уровне является синтез правастатина – ингибитора 3β-гидрокси-3-метилглутарил-КоА (HMG-CoA) редуктазы, которая является ферментом, контролирующим биосинтез холестерина. Правастатин был синтезирован компанией “Daiichi-Sankyo” (Япония) из соединения компактина, гидроксирование которого в положении C6 осуществляется с использованием бактериального фермента CYP105A3 (P450<sub>sca2</sub>) из *Streptomyces carbophilus*. Такие биореакторы разработаны с использованием дополнительных редокс белков-партнеров, NADPH как донора электронов и системы, регенерирующей NADPH [2]. Синтетические возможности CYP в качестве биореакторов реализованы только на единичных примерах. Препятствием для создания таких биореакторов является сложность организации CYP-систем: необходимость участия белков редокс партнеров (редуктаза, цитохрома b5, аденодоксины, флаводоксины), необходимость использования в качестве донора электронов дорогостоящего реагента NADPH, а также регенерирующей системы (например, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы как дополнительного фермента), несопряженность каталитического цикла, что приводит к низкому практическому выходу метаболита, часто низкая растворимость органических соединений в водных растворах [1, 3-6].





**Рисунок 1.** Потенциал цитохромов P450 как биосенсоров и биореакторов.

Электрохимическое восстановление СУР может служить адекватной заменой природным донорам электронов NADPH или NADH [9-11]. Такой подход является технологичным, что может проецироваться на создание биореакторов для электроферментативного синтеза метаболитов, для исследования их токсичности, для моделирования метаболизма ксенобиотиков [12]. Ранее были разработаны методы прямого электрохимического восстановления этого класса гемопротеинов без использования дополнительных медиаторов [10, 11], что позволило эффективно применять СУР-электроды для поиска новых субстратов, ингибиторов, активаторов, модуляторов СУР, а также для исследования межлекарственных взаимодействий [5, 11, 12]. Для разработки экспериментальных подходов с целью повышения каталитической активности электрохимических СУР-систем и сравнения результатов, полученных в разных каталитических системах, были исследованы электрохимические и электрокаталитические параметры СУР3А4 и маркерного субстрата – антибиотика группы макролидов эритромицина. В настоящей статье описаны алгоритмы, разработанные для повышения электроферментативной активности СУР.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Электрохимические измерения проводили с использованием потенциостата PGSTAT 12 Autolab, ("Metrohm Autolab Ins.", Нидерланды) с программным обеспечением GPES, (версия 4.9.7) и PGSTAT 312N Autolab с программным обеспечением NOVA (версия 2.0). В работе использовали трехконтактные электроды, получаемые методом трафаретной печати (ПГЭ) ("КолорЭлектроникс", Россия) с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлоридсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода составлял 0.2 см (площадь 0.0314 см<sup>2</sup>). Все потенциалы

приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения (отн. Ag/AgCl).

В работе были использованы следующие реактивы: ацетат аммония ("Sigma-Aldrich", США), ацетилацетон ("Fluka", Швейцария), гидроксид калия ("Спектр-Хим", Россия) дигидрофосфат калия ("Спектр-Хим"), дидодецилдиметиламмония бромид ("Sigma-Aldrich"), эритромицин ("Sigma-Aldrich"), уксусная кислота ("Fisher Scientific", США), хлорид натрия ("Спектр-Хим"), хлороформ ("Sigma-Aldrich"), рибофлавин ("Sigma-Aldrich"), флавинаденинмононуклеотид (FMN) ("Фармстандарт", Россия), флавинадениндинуклеотид (FAD) ("Fluka"), стрептолизин О из *Streptococcus pyogenes* ("Sigma-Aldrich"), бактосомы, содержащие СУР3А4 (концентрация СУР3А4 4 мМ), СУР-зависимую редуктазу человека и цитохромом *b<sub>5</sub>* (СУР3А4BR) в Трис-ацетатном буфере (pH 7.6), содержащем 250 мМ сахарозы, 0.025 ЭДТА ("Сурех Ltd", Великобритания).

Рекомбинантный СУР3А4 в 550 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7.2, содержащем 0.2% CHAPS, 1 мМ дитиотреитол и 20% глицерин (по объему), получен и выделен по методике, подробно описанной в работе [13] и предоставлен А.А. Гилепом (Институт биомедицинской химии). Концентрацию фермента (142 мкМ) определяли спектрофотометрически по образованию комплекса восстановленной формы гемопротеина с монооксидом углерода; коэффициент поглощения  $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$  [14]. Чистоту препарата контролировали электрофорезом в ПААГ.

Для модификации ПГЭ на рабочую поверхность электрода наносили 1 мкл 0.1 М дидодецилдиметиламмоний бромида (ДДАБ) в хлороформе, после испарения хлороформа на электрод наносили 1 мкл 142 мкМ СУР3А4.

Для иммобилизации нековалентного комплекса СУР3А4 с рибофлавином, FMN и FAD, растворы

флавиновых нуклеотидов и СУР3А4 смешивали в эквимолярных концентрациях, инкубировали 5 мин и наносили на поверхность ПГЭ, модифицированную ДДАБ (ПГЭ/ДДАБ).

В качестве трехмерного пористого материала были использованы мембраны из анодного оксида алюминия, содержащие сонаправленные поры диаметром 0.1 мкм и 0.2 мкм (Anodisc 13, Whatman™, “Cytiva”). На рабочий электрод, модифицированный ДДАБ (ПГЭ/ДДАБ), помещали мембраны с диаметром, соответствующим диаметру рабочего электрода. Иммунизацию фермента проводили по методике, описанной выше.

Для модификации электрода порообразующим белком стрептолизин О на ПГЭ/ДДАБ наносили 1 мкл предварительно проинкубированной в течение 30 мин смеси равных объемов 4 мг/мл стрептолизина О и 10 мМ DL-дитиотреитола. После полного высыхания предыдущего слоя наносили 1 мкл 142 мкМ СУР3А4.

Для иммобилизации бактосом, содержащих СУР3А4 (СУР3А4BR), 2 мкл СУР3А4BR наносили на электроды, модифицированные ДДАБ (ПГЭ/ДДАБ) по методике, описанной выше.

Для всех типов модификаций для иммобилизации фермента электроды оставляли при 4°C на 12 ч во влажной камере для предотвращения дегидратации фермент-содержащего слоя на поверхности рабочего электрода.

Для оценки эффективности электрокатализа СУР3А4 проводили электролиз в присутствии 100 мкМ эритромицина в течение 20 мин при рабочем потенциале  $E = -0.5$  В (отн. Ag/AgCl). Полученный после электролиза раствор, содержащий непрореагировавший субстрат эритромицин и метаболиты электроферментативной реакции, смешивали в равных пропорциях с реактивом Nash и спектрофотометрически при длине волны 412 нм определяли концентрацию формальдегида как основного продукта реакции N-деметилирования эритромицина [15].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Электроферментативные системы на основе СУР 3А4*

СУР обладают сложным и многостадийным каталитическим циклом, в котором участвуют ряд белков редокс-партнеров, таких как ферредоксины, аденодоксины, NADPH-зависимая СУР редуктаза, цитохром *b5*. Использование электрохимических систем позволяет сократить многостадийный процесс, поставляя электроны непосредственно к гемму как основному каталитическому центру цитохрома P450. Кроме того, электрохимические системы на основе цитохрома P450 обладают рядом преимуществ по сравнению с другими подходами для создания биосенсоров и биореакторов:

- каталитическая реакция иммобилизованного на электроде белка протекает с высокой скоростью, которая зависит от типа электрода и скорости электронного транспорта, в отличие от реконструированных систем, содержащих, кроме СУР, белки редокс-партнеры,

доноры электронов (кофакторы NADPH или NADH) и протекающих в растворе, где скорость реакции зависит, в том числе и от вероятности соударения молекул;

- миниатюризация процесса, так как для иммобилизации на электроде используются минимальные количества препарата фермента, что позволяет более продуктивно использовать белок;

- возможность регистрации каталитических и кинетических параметров, непосредственно в момент протекания метаболических превращений.

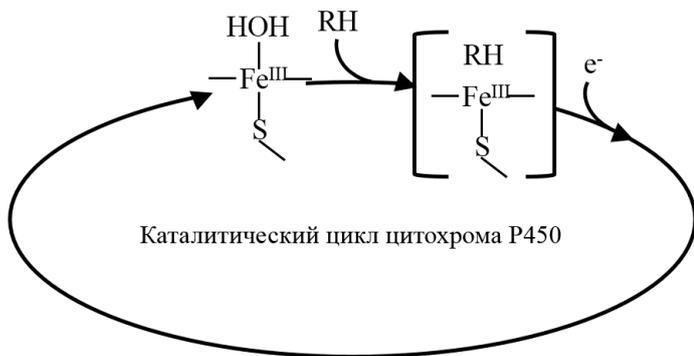
Перечисленные выше преимущества электрохимических систем цитохрома P450 делают их эффективным инструментом для поиска субстратов и ингибиторов СУР, для анализа возможных межлекарственных взаимодействий, а также для создания эффективных электроферментативных каталитических систем для получения продуктов реакций, катализируемых цитохромами P450.

### *Модификация рабочей электродной поверхности*

Для создания биосенсора на основе цитохрома P450 необходимо создать систему, обеспечивающую сохранение каталитических свойств фермента, способствующих протеканию электрохимической реакции. Для иммобилизации СУР на поверхности электродов разработаны различные подходы, использующие наноматериалы и модификаторы, обеспечивающие сохранение нативной конформации и каталитических свойств фермента [10-12, 16, 17]. Разработан метод эффективной иммобилизации СУР3А4 с использованием электродов, получаемых методом трафаретной печати (печатные электроды) с графитовым рабочим электродом, модифицированным липидоподобным соединением дидодецилдиметиламмоний бромидом (ДДАБ), моделирующим мембранное микроокружение ферментов. Такой тип электродов был применен для исследования межлекарственных взаимодействий в системах омепразол/эритромицин, абиратерон/эритромицин, диклофенак/эритромицин, кортизол/эритромицин, кетоконазол/абиратерон [18-25]. Кроме модификаторов на основе ДДАБ, для иммобилизации СУР нами были использованы золотые наночастицы, а также дисперсии углеродных нанотрубок, стабилизированных различными полимерными композициями [26, 27].

### *Каталитический механизм функционирования СУР как основа для создания эффективных биореакторов. Образование продуктивного фермент-субстратного комплекса*

Особенностью каталитического цикла СУР является многостадийность процесса. Первая стадия в катализе этого класса гемопротеинов – образование комплекса ферри-формы  $Fe^{III}$  с субстратом ( $Fe^{III}$ -RH). Электроны начинают участвовать в каталитическом процессе только после образования фермент-субстратного комплекса [19]. Перенос первого электрона приводит к образованию комплекса восстановленной ферро-формы  $Fe^{II}$  с субстратом, а



**Рисунок 2.** Образование фермент-субстратного комплекса как первая стадия каталитического цикла CYP и последующее присоединение электрона [31].

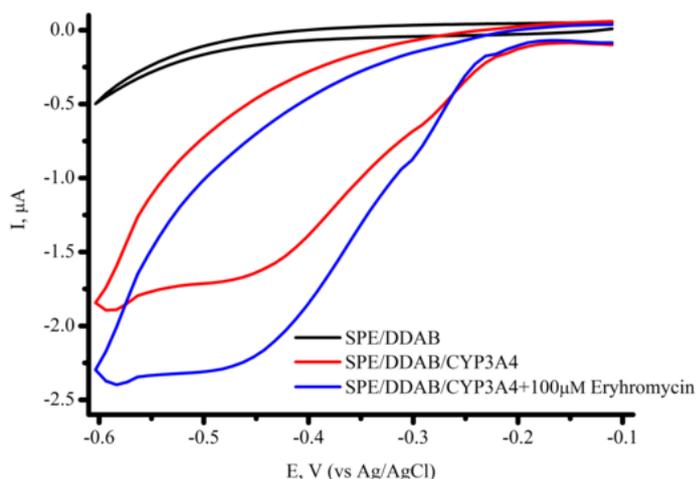
затем и с кислородом в качестве второго субстрата [16, 28-30] (рис. 2).

Электрохимические процессы CYP-зависимых реакций характеризуются режимом тонкой пленки белка (сорбционный режим) на поверхности электрода. Эти процессы не являются диффузионно-контролируемыми, что проявляется в линейной зависимости максимальной амплитуды анодного и катодного тока от скорости сканирования, как было показано ранее [1, 10, 33]. Количественные закономерности электрохимических методов позволяют оценить количество электроактивного фермента на электроде для адекватного расчета кинетических параметров электроферментативной реакции (рис. 3) [10, 11, 33].

Для фермента, иммобилизованного (ковалентно или нековалентно) на электроде или включенного в матрицу модификатора, образование фермент-субстратного комплекса может потребовать больше времени за счет диффузии субстрата к активному центру фермента. Нами был предложен подход, при котором первой стадией электрокатализа была не стадия восстановления иона железа гема, а именно стадия образования фермент-субстратного комплекса для дальнейшей продуктивной работы системы. Предварительная инкубация CYP 3A4, нековалентно иммобилизованного на электроде за счет включения в матрицу ДДАБ с субстратом (антибиотиком группы макролидов эритромицином) до стадии получения электронов, положительно влияла на каталитические функции фермента [32]. Выход продукта реакции N-деметилирования эритромицина - формальдегида, возрос в 1.46 раза, а максимальная скорость реакции увеличилась с  $9.21 \times 10^{-11}$  М/мин до  $1.40 \times 10^{-10}$  М/мин.

*Флавиновые нуклеотиды как диффузионные медиаторы переноса электронов и низкомолекулярные модели NADPH-зависимой CYP редуктазы*

Флавиновые нуклеотиды являются кофакторами редуктаз – белков редокс-партнеров CYP – и, соответственно, посредниками в передаче электронов между восстановительным эквивалентом NADPH и CYP, согласно общепринятой схеме электронного транспорта (рис. 4) [32]. Для моделирования классической электрон-транспортной схемы на электроде были использованы различные подходы,



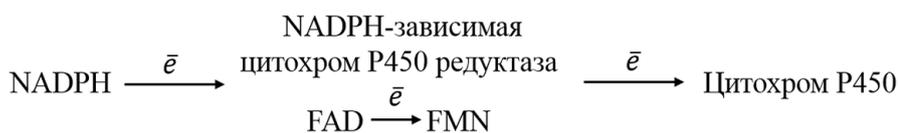
**Рисунок 3.** Циклические вольтамперограммы CYP3A4, иммобилизованного на ПГЭ, модифицированных ДДАБ, в аэробных условиях и в присутствии субстрата эритромицина в диапазоне потенциалов от 0.1 до -0.6 В (отн. Ag/AgCl) при скорости сканирования 0.1 В/с.

основанные на образовании комплексов или на включении флавиновых кофакторов или флавино-содержащих доменов в структуру CYP в роли диффузионных медиаторов переноса электронов.

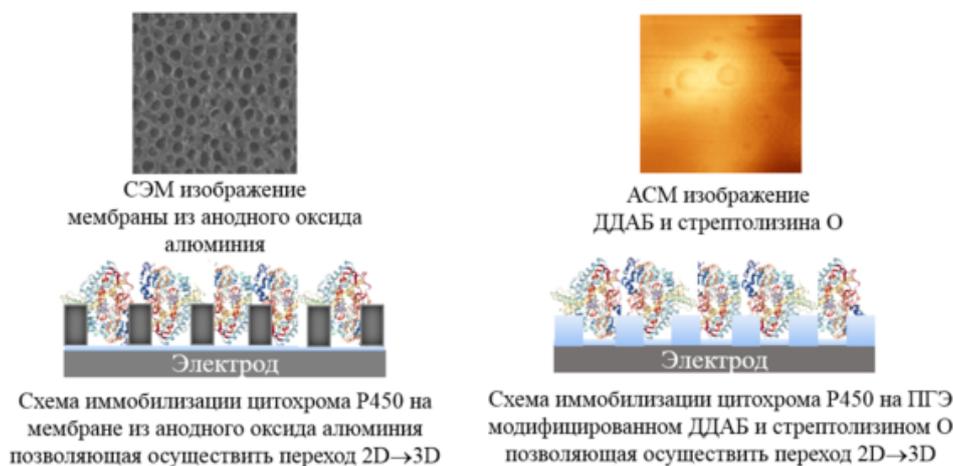
Была исследована электрохимическая система, в которой нековалентный комплекс CYP3A4 с рибофлавином, FMN или FAD был иммобилизован на электроде [32]. Флавиновые нуклеотиды, как низкомолекулярные модели редуктазы, являются медиаторами электронного транспорта, способствуя эффективному восстановлению иона железа гема. При использовании флавиновых нуклеотидов в качестве низкомолекулярных моделей редуктазы удалось достичь улучшения электрохимических характеристик системы, таких как электроактивная концентрация фермента, а также рост такого параметра, как каталитический ток в присутствии субстрата, который является одной из важнейших характеристик эффективности электрокатализа. Каталитическая активность CYP 3A4-зависимой реакции N-деметилирования эритромицина возросла в 1.3, 1.7 и 2.1 раза в системе с рибофлавином, FAD и FMN соответственно. Максимальная скорость реакции для системы без флавинов, составила  $9.21 \times 10^{-11}$  М/мин,  $1.24 \times 10^{-10}$  М/мин – в случае рибофлавина,  $1.57 \times 10^{-10}$  М/мин и  $1.87 \times 10^{-10}$  М/мин для FAD и FMN соответственно [32].

*Модификация поверхности электродов трехмерными структурами для включения фермента в ограниченный объем и перехода от 2D- к 3D-режиму*

Электроды, применяемые в биоэлектрохимии, как правило, представляют собой плоские структуры. Для эффективного электронного транспорта к активному центру фермента требуется иммобилизация белка на рабочей поверхности электрода. При этом существует проблема взаимодействия белка с «твердыми» 2D-поверхностями [34], что может приводить к изменению третичной и четвертичной структуры белка, влияющей на



**Рисунок 4.** Электрон-транспортный путь в системе СYP.



**Рисунок 5.** Схема иммобилизации СYP3A4 по стратегии перехода от 2D- к 3D-поверхности.

каталитическую активность. Для преодоления плоскостной структуры электродов был предложен алгоритм модификации поверхности электрода нанопористыми неорганическими или органическими (порообразующие белки) компонентами. В качестве неорганических структур использовались материалы на основе мезопористого оксида кремния, оксида алюминия, оксида титана, мезопористого графена, оксида олова, допированного индием (indium doped tin oxide, (ИТО) [35-41]. Применение нанопористых материалов для электрохимического изучения ферментативных реакций обеспечивает переход электродной поверхности от 2D- к 3D-режиму, способствует более упорядоченному расположению белка на электроде, а также повышению локальной концентрации фермента в нанопорах, что выражается в увеличении эффективности электроферментативных реакций [36, 39, 41, 42]. В качестве нанопористых материалов могут использоваться структуры, обладающие следующими свойствами: химическая инертность, биосовместимость, электрохимическая нейтральность при сохранении электронтранспортных и проводящих свойств электрода. Проведение ферментативных реакций в «замкнутых» пространствах (нанопорах, наноканалах, мицеллах, обращенных мицеллах) позволяет смоделировать микроокружение ферментов и их молекулярную скученность («краудинг») в биологических системах, где ферменты находятся в высоких концентрациях в ограниченных объемах [39, 42, 43]. Такие подходы перспективны для создания нанореакторов на основе ферментов, каскадов ферментативных реакций и ансамблей ферментов [44].

Нами была разработана система, в которой в качестве нанопористого материала использовался анодный оксид алюминия для модификации поверхности электрода (рис. 5).

Эффективность использования 3D-модификаторов электродов была продемонстрирована в наших

экспериментах. Выход продукта реакции N-деметилирования эритромицина, катализируемый СYP3A4, при использовании пор размером 100 нм мембраны анодного оксида алюминия увеличивался в 2.32 раза, а при размере пор 200 нм – в 1.32 раза. Такое различие может быть обусловлено более упорядоченной ориентацией молекулы фермента в порах меньшего размера [45]. Для СYP3A4, иммобилизованного на электроде без нанопористого материала, скорость реакции составила  $(4.3 \pm 0.4) \times 10^{-11}$  М/мин; для пор с диаметром 100 нм и 200 нм –  $(1.01 \pm 0.04) \times 10^{-10}$  М/мин и  $(5.7 \pm 0.3) \times 10^{-11}$  М/мин соответственно.

Совмещение двух подходов – создание мембраноподобного слоя и иммобилизация цитохрома P450 3A4 в замкнутом пространстве, моделирующим краудинг-эффект – было реализовано нами в работе [46]. Для этого был использован липидоподобный модификатор электрода ДДАБ и мембранный белок стрептолизин O (рис. 5). При послойном нанесении на электрод ДДАБ, а затем стрептолизина O в мембранной пленке, образованной ДДАБ, наблюдалось появление полостей, визуализируемых на изображениях, полученных с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Данный подход позволил зарегистрировать увеличение каталитического тока СYP 3A4 в присутствии субстрата эритромицина в 2 раза (с 0.6 мкА до 1 мкА) и повысить эффективность электрокатализа реакции N-деметилирования эритромицина в 2.97 раза [47].

*Микросомы как активные биотрансформирующие системы. Иммобилизация микросом на электроде*

Электрон-транспортный путь в СYP-системах реализуется с помощью белков-партнеров [28, 31]. Поэтому использование наиболее близких к природным системам конструкций является эффективным путем для повышения каталитических свойств биокатализаторов.

**Таблица 1.** Сравнение электроаналитических и электрокаталитических характеристик предложенных модификаций электродной поверхности с целью повышения эффективности электрокатализа.

Электрод	$E_{red}$ , В	$E_{cat}$ , В	$E_{onset}$ , В	$I_{O_2}$ , $A \times 10^{-7}$	$I_{Er}$ , $A \times 10^{-7}$	$I_{Er}/I_{O_2}$	$V_{max}$ , М/мин
ПГЭ/ДДАБ/ СУР3А4	-0.438 $\pm 0.006$	-0.438 $\pm 0.006$	-0.228 $\pm 0.003$	-3.71 $\pm 0.51$	-6.05 $\pm 0.63$	1.63 $\pm 0.14$	$9.21 \pm 1.69$ $\times 10^{-11}$
ПГЭ/ДДАБ/ СУР3А4+ФМН	-0.452 $\pm 0.01$	-0.439 $\pm 0.012$	-0.184 $\pm 0.006$	-7.47 $\pm 1.32$	-4.83 $\pm 1.2$	0.65 $\pm 0.15$	$1.87 \pm 0.19$ $\times 10^{-10}$
ПГЭ/ДДАБ/ СУР3А4+ФАД	-0.462 $\pm 0.001$	-0.459 $\pm 0.006$	-0.201 $\pm 0.002$	-8.25 $\pm 1.13$	-6.26 $\pm 1.21$	0.75 $\pm 0.05$	$1.58 \pm 0.14$ $\times 10^{-10}$
ПГЭ/ДДАБ/ СУР3А4 +рибофлавин	-0.457 $\pm 0.007$	-0.447 $\pm 0.007$	-0.211 $\pm 0.003$	-7.14 $\pm 2.29$	-6.01 $\pm 0.34$	0.89 $\pm 0.25$	$1.24 \pm 0.07$ $\times 10^{-10}$
ПГЭ/Anodisc 100 мкм/ДДАБ/ СУР3А4	-0.368 $\pm 0.005$	-0.385 $\pm 0.021$	-0.205 $\pm 0.008$	-1.01 $\pm 0.43$	-1.30 $\pm 0.83$	1.12 $\pm 0.8$	$1.01 \pm 0.04$ $\times 10^{-9}$
ПГЭ/Anodisc 200 мкм /ДДАБ/ СУР3А4	-0.342 $\pm 0.022$	-0.402 $\pm 0.013$	-0.229 $\pm 0.005$	-1.61 $\pm 0.82$	-1.07 $\pm 0.76$	0.73 $\pm 0.13$	$5.73 \pm 0.3$ $\times 10^{-10}$
ПГЭ/ДДАБ/ SLO/СУР3А4	-0.462 $\pm 0.001$	-0.445 $\pm 0.006$	-0.264 $\pm 0.020$	-9.01 $\pm 1.59$	-12.22 $\pm 2.49$	1.57 $\pm 0.17$	$4.52 \pm 0.33$ $\times 10^{-10}$
ПГЭ/ДДАБ/ СУР3А4BR	-0.432 $\pm 0.014$	-0.417 $\pm 0.023$	-0.294 $\pm 0.006$	-2.36 $\pm 0.79$	-2.81 $\pm 0.53$	1.19 $\pm 0.17$	$2.34 \pm 0.48$ $\times 10^{-10}$

**Примечание.**  $E_{red}$  - потенциал пика восстановления СУР;  $E_{cat}$  – потенциал пика восстановления СУР в присутствии субстрата;  $E_{onset}$  – потенциал начала катализа субстрата;  $I_{O_2}$  – каталитический ток восстановления цитохрома Р450 в присутствии кислорода;  $I_{Er}$  – каталитический ток восстановления цитохрома Р450 в присутствии субстрата;  $V_{max}$  – максимальная скорость ферментативной электрокаталитической реакции. Результаты получены из 3 опытов.

Микросомы представляют собой морфологически замкнутые везикулы, содержащие компоненты СУР-монооксигеназной системы, которые образуются из эндоплазматического ретикулума при гомогенизации ткани [47-52]. Микросомы печени, содержащие СУР и их редокс-партнеры (CPR и цитохром  $b_5$ ) используются как источник ферментов СУР для анализа токсичности *in vitro* и разработки новых лекарственных препаратов. Основным преимуществом использования микросом является сохранение стабильности структуры фермента и каталитической активности за счет микроокружения, которое не изменяется после выделения микросомальной фракции. Кроме того, белки редокс-партнеры также способствуют повышению скорости переноса электронов от электрода к активному центру СУР [53]. Однако использование собственно микросом человека и животных имеет этические проблемы. С развитием методических подходов молекулярной биологии и технологий экспрессирования белков стала доступна коэкспрессия в культурах клеток, инфицированных рекомбинантными бакуловирусами, или в бактериальных клетках одновременно СУР, редуктазы и цитохрома  $b_5$ . Получаемые данным методом биологические материалы коммерчески доступны и реализуются под названиями бактосомы (Bactosomes™, компания «Сурех»), суперсомы (Supersomes™, «Gen Test») или бакулосомы (Baculosomes™, «ThermoFisher») [49, 54].

Для иммобилизации бактосом, содержащих СУР3А4, были применены электроды, модифицированные ДДАБ. В присутствии субстрата эритромицина регистрируется каталитический ток, что свидетельствует об активности и взаимодействии ключевого фермента СУР3А4 с субстратом (табл. 1). Бактосомы продемонстрировали высокую скорость электроферментативных реакций по отношению к эритромицину. Были получены следующие значения максимальной скорости электрохимической реакции  $2.34 \pm 0.48 \times 10^{-10}$  М/мин для электрода с иммобилизованными бактосомами, содержащими СУР3А4, и

$1.52 \pm 0.34 \times 10^{-10}$  М/мин для электрода с иммобилизованным СУР3А4.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе представлены разработанные нами подходы расширения области применения СУР не только в качестве биосенсоров для поиска субстрат-ингибиторного потенциала этого класса гемопротеинов, но и для реализации электроферментативных систем в качестве биореакторов. Использование СУР 3А4 в комплексе с флавиновыми нуклеотидами как низкомолекулярной модели редуктазы, модификация электродов нанопоровыми материалами, иммобилизация СУР 3А4-бактосом на электродах, способствует повышению каталитической активности. Образование фермент-субстратного комплекса на электроде как первой стадии электроферментативной реакции также дает в результате повышение каталитической активности системы. Включение ферментов в неорганические (анодный оксид алюминия) и органические (стрептолизин О) нанопоры также приводит к улучшения как электроаналитических, так и электрокаталитических характеристик системы. Функционирование ферментов в режиме «структурного краудинга» за счет концентрирования фермента в нанопорах является существенным фактором для перевода фермента в режим биореактора и для повышения выхода продукта реакции.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской

Федерации на долгосрочный период 2021 - 2030 годы (№122030100168-2).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

## ЛИТЕРАТУРА

- Nikzad, N., Rafiee, M. (2024) Electrochemical Study of Drug Metabolism. *Current Opinion in Electrochemistry*, 101446. DOI: 10.1016/j.coelec.2024.101446
- Hara, Y., Nagaoka, S. (2019). Pravastatin (Pravachol, Mevalotin). In *Drug Discovery in Japan* (S. Nagaoka eds.) Springer, Singapore, pp. 35-49. DOI: 10.1007/978-981-13-8906-1\_3
- Mi, L., Wang, Z., Yang, W., Huan, C., Zhou, B., Hu, Y., Liu, S. (2023) Cytochromes P450 in biosensing and biosynthesis applications: Recent progress and future perspectives. *Trends in Analytical Chemistry*, **158**, 116791. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116791
- Klyushova, L.S.; Perepechaeva, M.L.; Grishanova, A.Y. (2022) The Role of CYP3A in Health and Disease. *Biomedicines*, **10**, 2686. DOI:10.3390/biomedicines10112686
- Krishnan, S. (2020) Bioelectrodes for evaluating molecular therapeutic and toxicity properties. *Current Opinion in Electrochemistry*, **19**, 20–26. DOI: 10.1016/j.coelec.2019.09.004
- Di Nardo, G., Gilardi, G. (2020) Natural Compounds as Pharmaceuticals: The Key Role of Cytochromes P450 Reactivity. *Trends in Biochemical Sciences*, **45**(6), 511-525. DOI: 10.1016/j.tibs.2020.03.004
- Bernhardt, R., Urlacher, V.B. (2014) Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98** (14), 6185–6203. DOI: 10.1007/s00253-014-5767-7
- Sakaki, T. (2012) Practical application of cytochrome P450. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **35**(6), 844–849. DOI: 10.1248/bpb.35.844
- Sun, X., Sun, J., Ye, Y., Ji, J., Sheng, L., Yang, D., Sun, X. (2023) Metabolic pathway-based self-assembled Au@MXene liver microsomes electrochemical biosensor for rapid screening of aflatoxin B1. *Bioelectrochemistry*, **151**, 108378. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2023.108378
- Shumyantseva, V.V., Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Bulko, T.V., Archakov, A.I. (2018) From electrochemistry to enzyme kinetics of cytochrome P450. *Biosensors and Bioelectronics*, **15**, 192-204. DOI: 10.1016/j.bios.2018.08.040
- Schneider, E., Clark, D. S. (2013) Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **39**, 1-13, DOI: 10.1016/j.bios.2012.05.043.
- Koroleva, P.I., Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Filimonov, D.A., Dmitriev, A.V., Zaviyalova, M.G., Rikova, S.M., Shikh, E.V., Makhova, A.A., Bulko, T.V., Gilep, A.A., Shumyantseva, V.V. (2021) Modeling of drug-drug interactions between omeprazole and erythromycin in the cytochrome P450-dependent system in vitro. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **15**(1), 62–70. DOI: 10.1134/S1990750821010030.
- Gilep, A.A., Guryev, O.V., Usanov, S.A., Estabrook, R.W. (2001) Reconstitution of the enzymatic activities of cytochrome P450s using recombinant flavocytochromes containing rat cytochrome b(5) fused to NADPH-cytochrome P450 reductase with various membrane-binding segments. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **390**(2), 215–221. DOI:10.1006/abbi.2001.2372
- Omura, T., Sato, R. (1964) The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: II. Solubilization, purification, and properties. *Journal of Biological Chemistry*, **239**(7), 2379–2385. DOI: 10.1016/S0021-9258(20)82245-5
- Nash T. (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochemical Journal*, **55**(3), 416-421. DOI: 10.1042/bj0550416
- Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Suprun, E.V., Chalenko, Y.M., Vagin, M.Y., Rudakov, Y.O., Shatskaya, M.A., Archakov, A.I. (2011) Electrochemical investigations of cytochromes P450. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, **1814**(1), 94-101. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.07.008
- Ducharme, J., Auclair, K. (2018) Use of bioconjugation with cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, **1866**(1), 32-51, DOI: 10.1016/j.bbapap.2017.06.007
- Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Kuzikov, A.V., Archakov, A.I., Makhova, A.A., Shikh, E.V., Kukes, V. (2015) Electrocatalytic cycle of P450 cytochromes: the protective and stimulating roles of antioxidants. *RSC Advances*, **5**(87), 71306-71313. DOI: 10.1039/C5RA09998F
- Shumyantseva, V.V., Koroleva, P.I., Bulko, T.V., Sergeev, G.V., Usanov, S.A. (2022) Predicting drug-drug interactions by electrochemically driven cytochrome P450 3A4 reactions. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, **37**(3), 241-248. DOI: 10.1515/dmpt-2021-0116
- Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Koroleva, P.I., Shikh, E.V., Makhova, A.A., Kisel, M.S., Haidukevich I.V., Gilep A.A. (2022) Human Cytochrome P450 2C9 and its polymorphic modifications: electroanalysis, catalytic properties, and approaches to the regulation of enzymatic activity. *Processes*, **10**, 383. DOI: 10.3390/pr10020383
- Agafonova L.E., Bulko T.V., Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Shumyantseva V.V. (2022) Sensors for analysis of drugs, drug-drug interactions, and catalytic activity of enzymes. *Bulletin of Russian State Medical University*, **1**, 41-46. DOI: 10.24075/brsmu.2022.009
- Kuzikov, A., Masamrekh, R., Shkel, T., Strushkevich, N., Gilep, A., Usanov, S., Archakov, A., Shumyantseva V. (2019) Assessment of electrocatalytic hydroxylase activity of cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) by means of derivatization of 6 $\beta$ -hydroxycortisol by sulfuric acid for fluorimetric assay. *Talanta*, **196**, 231–236. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.12.041
- Masamrekh, R.A., Kuzikov, A.V., Haurychenka, Y.I., Shcherbakov, K.A., Veselovsky, A.V., Filimonov, D.A., Dmitriev, A.V., Zaviyalova, M.G., Gilep, A.A., Shkel, T.V., Strushkevich, N.V., Usanov, S.A., Archakov, A.I., Shumyantseva V.V. (2020) In vitro interactions of abiraterone, erythromycin, and CYP3A4: implications for drug-drug interactions. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, **34**, 120-130. DOI: 10.1111/fcp.12497
- Makhova, A.A., Shikh, E.V., Bulko, T.V., Gilep, A.A., Usanov, S.A., Shumyantseva, V.V. (2020) No effect of lipoic acid on catalytic activity of cytochrome P450 3A4. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, **35**(3), 20200105. DOI: 10.1515/dmpt-2020-0105
- Masamrekh, R., Kuzikov, A., Veselovsky, A., Toropygin, I., Shkel, T., Strushkevich, N., Gilep, A., Usanov, S., Archakov, A., Shumyantseva, V. (2018) 17 $\alpha$ -hydroxylase (CYP17A1) inhibitors – abiraterone and galeterone – interact with human sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1). *Journal of Inorganic Biochemistry*, **186**, 24–33. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2018.05.010
- Kuzikov, A.V., Bulko, T.V., Koroleva, P.I., Masamrekh, R.A., Babkina, S.S., Gilep, A.A., Shumyantseva, V.V. (2020) Cytochrome P450 3A4 as a Drug Metabolizing Enzyme: the Role of Sensor System Modifications in Electrocatalysis and Electroanalysis. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **14**(3), 252–259. DOI: 10.1134/S1990750820030075
- Shumyantseva, V.V., Agafonova, L.E., Bulko, T.V., Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Yuan, Ji., Pergushov, D.V., Sigolaeva, L.V. (2021) Electroanalysis of Biomolecules: Rational Selection of Sensor Construction. *Biochemistry (Moscow)*. Special issue. *Biological Chemistry reviews*, **86**(Suppl.1), S140-S151. DOI: 10.1134/S0006297921140108
- Guengerich, F.P. (2021) Drug Metabolism: Cytochrome P450, In *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier, Netherlands. DOI: 10.1016/B978-0-12-820472-6.99996-1
- Lamb, D.C., Waterman, M.R., Kelly, S.L., Guengerich, F.P. (2007) Cytochromes P450 and drug discovery. *Current Opinion in Biotechnology*, **18**(6), 504-512. DOI: 10.1016/j.copbio.2007.09.010
- Bavishi, K., Laursen, T., Martinez, K.L., Moller, B.L., Della Pia, E.A. (2016) Application of nanodisc technology for direct electrochemical investigation of plant cytochrome P450s and their NADPH P450 oxidoreductase. *Scientific Reports*, **6**, 29459. DOI: 10.1038/srep29459
- Koroleva, P.I., Bulko, T.V., Agafonova, L.E., Shumyantseva, V.V. (2023) Catalytic and Electrocatalytic Mechanisms of Cytochromes P450 in the Development of Biosensors and Bioreactors. *Biochemistry (Moscow)*, **88**(10), 1645-1657. DOI: 10.1134/S0006297923100176
- Shumyantseva V.V., Koroleva P.I., Bulko T.V., Shkel T.V., Gilep A.A., Veselovsky A.V. (2023) Approaches for increasing the electrocatalytic efficiency of Cytochrome P450 3A4. *Bioelectrochemistry*, **149**, 108277. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108277
- Rusling, F., Wang, B., Yun, S. (2008). Electrochemistry of redox enzymes, In *Bioelectrochemistry: Fundamentals*, In *Experimental Techniques and Applications* (P.N. Bartlett ed.), John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, pp. 39–85. DOI: 10.1002/9780470753842.ch2
- Gray, J.J. (2004) The interaction of proteins with solid surfaces. *Current Opinion in Structural Biology*, **14**, 110-115. DOI:10.1016/j.sbi.2003.12.001
- Shumyantseva, V.V., Koroleva, P.I., Bulko, T.V., Agafonova, L.E. (2023) Alternative electron sources for cytochrome P450s catalytic cycle: biosensing and biosynthetic application. *Processes*, **11**, 1801. DOI:10.3390/pr11061801
- Shumyantseva, V.V., Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Philippova, T.A., Koroleva, P.I., Agafonova, L.E., Bulko, T.V., Archakov, A.I. (2022) Enzymology on an electrode and in a nanopore: analysis algorithms, enzyme kinetics and perspectives. *BioNanoScience*, **12**, 1341-1355. DOI: 10.1007/s12668-022-01037-2
- Shangguan, L., Wei, Y., Liu, X., Yu, J., Liu, S. (2017) Confining a bi-enzyme inside the nanochannels of a porous aluminum oxide membrane for accelerating the enzymatic reactions. *Chemical Communications*, **53**, 2673-2676. DOI: 10.1039/C7CC00300E
- Mie, Y., Ikegami, M., Komatsu, Y. (2016) Nanoporous Structure of Gold Electrode Fabricated by Anodization and Its Efficacy for Direct Electrochemistry of Human Cytochrome P450. *Chemistry Letters*, **45**, 640–642. DOI: 10.1246/cl.160164
- Dai, Q., Yang, L., Wang, Y., Cao, X., Yao, C., Xu, X. (2020) Surface charge-controlled electron transfer and catalytic behavior of immobilized cytochrome P450 BM3 inside dendritic mesoporous silica nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **412**, 4703-4712. DOI: 10.1007/s00216-020-02727-0
- Xu, X., Zheng, Q., Bai, G., Dai, Q., Cao, X., Yao, Y., Liu, S., Yao, C. (2018) Polydopamine functionalized nanoporous graphene foam as nanoreactor for

- efficient electrode-driven metabolism of steroid hormones. *Biosensors and Bioelectronics*, **119**, 182-190, DOI:10.1016/j.bios.2018.08.009
41. Lu, J., Li, H., Cui, D., Zhang, Y., Liu, S. (2014) Enhanced enzymatic reactivity for electrochemically driven drug metabolism by confining cytochrome P450 enzyme in TiO<sub>2</sub> nanotube arrays. *Analytical Chemistry*, **86**, 8003–8009. DOI:10.1021/ac502234x
42. Meyer, N., Abrao-Nemeir, I., Janot, J.-M., Torrent, J., Lepoitevin, M., Balme, S. (2021) Solid-state and polymer nanopores for protein sensing. *Advances in Colloid and Interface Science*, **298**, 102561. DOI:10.1016/j.cis.2021.102561
43. Kuchler, A., Yoshimoto, M., Luginbühl, S., Mavelli, F., Walde, P. (2016) Enzymatic reactions in confined environments. *Nature Nanotechnology*, **11**, 409-420. DOI:10.1038/nnano.2016.54
44. González-Davis, O., Chauhan, K., Zapian-Merino, S., Vazquez-Duhalt, R. (2020) Bi-enzymatic virus-like bionanoreactors for the transformation of endocrine disruptor compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, **146**, 415-421. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.272
45. Kumar, R., Sharma, D., Kumar, V., Kumar, R. (2018) Factors defining the effects of macromolecular crowding on dynamics and thermodynamic stability of heme proteins in-vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **654**, 146–162. DOI:10.1016/j.abb.2018.07.018
46. Shumyantseva, V.V., Koroleva, P.I., Gilep, A.A., Napolskii, K.S., Ivanov, Yu.D., Kanashenko, S.L., Archakov, A.I. (2022) Increasing the efficiency of cytochrome P450 3A4 electrocatalysis using electrode modification with spatially ordered anodic aluminum oxide-based nanostructures for investigation of metabolic transformations of drugs. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, **506**, 215-219, DOI:10.1134/S1607672922050131
47. Koroleva, P.I., Gilep, A.A., Kraevskiy, S.V., Tsybruk, T.V., Shumyantseva, V.V. (2023) Improving the efficiency of electrocatalysis of cytochrome P450 3A4 by modifying the electrode with membrane protein streptolysin O for studying the metabolic transformations of drugs. *Biosensors*, **13**, 457. DOI: 10.3390/bios13040457
48. Nerimetta, R., Krishnan, S. (2015) Electrocatalysis by subcellular liver fractions bound to carbon nanostructures for stereoselective green drug metabolite synthesis. *Chemical Communications*, **51**, 11681-11684. DOI: 10.1039/c5cc03364k
49. Xu, X., Bai, G., Song, L., Zheng, Q., Yao, Y., Liu, S., Yao, C. (2017) Fast steroid hormone metabolism assays with electrochemical liver microsomal bioreactor based on polydopamine encapsulated gold-graphene nanocomposite. *Electrochimica Acta*, **258**, 1365-1374. DOI: 10.1016/j.electacta.2017.11.195
50. Nerimetta, R., Premaratne, G., Liu, H., Krishnan, S. (2018) Improved electrocatalytic metabolite production and drug biosensing by human liver microsomes immobilized on amine-functionalized magnetic nanoparticles. *Electrochimica Acta*, **280**, 101-107. DOI: 10.1016/j.electacta.2018.05.085
51. Nerimetta, R., Walgama, C., Singh, V., Hartson, S.D., Krishnan, S. (2017) Mechanistic insights on the voltage-driven biocatalysis of a cytochrome P450 batosomal film on a self-assembled monolayer. *ACS Catalysis*, **7**, 3446-3453. DOI: 10.1021/acscatal.6b03588
52. Archakov, A.I. (1975) *Microsomal oxidation*. Nauka, Moscow, 327 p.
53. Panicco, P., Castrignanò, S., Sadeghi, S.J., Di Nardo, G., Gilardi, G. (2021) Engineered human CYP2C9 and its main polymorphic variants for bioelectrochemical measurements of catalytic response. *Bioelectrochemistry*, **138**, 107729. DOI:10.1016/j.bioelechem.2020.107729
54. Walgama, C., Nerimetta, R., Materer, N.F., Schildkraut, D., Elman, J.F., Krishnan, S. (2015) A Simple Construction of Electrochemical Liver Microsomal Bioreactor for Rapid Drug Metabolism and Inhibition Assays. *Analytical Chemistry*, **87**(9), 4712–4718. DOI:10.1021/ac5044362

Поступила: 09.01.2024  
После доработки: 02.02.2024  
Принята к публикации: 05.02.2024

## COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOELECTROCATALYTIC CYTOCHROME P450 3A4 SYSTEMS

*P.I. Koroleva, V.V. Shumyantseva\**

Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya Street, 10, Moscow 119121, Russia

\* e-mail: viktorina.shumyantseva@ibmc.msk.ru

This article describes the approaches developed by the authors with the aim to increase the efficiency of electro enzymatic reactions catalyzed by cytochrome P450 3A4. A comparative analysis of cytochrome P450 3A4 systems was carried out during the formation of the functional complexes hemoprotein-flavin nucleotides as low-molecular models of NAD(P)H-dependent cytochrome P450 reductase. The formation of a productive enzyme-substrate complex before the stage of accepting electrons from the modified electrode was studied from the electrocatalytic viewpoint. Incorporation of the enzyme into nanopores of different nature on the electrode (2D-3D transition) was also studied. The results on the electrochemical reduction of batosomes as the functionally active models of the microsomal monooxygenase system are also considered. The electrochemical and electrocatalytic parameters of cytochrome P450 3A4 were compared for different models of the electrocatalytic generation of metabolites.

**Key words:** electroanalysis, drugs, cytochrome P450 3A4, bioreactor, enzymatic catalysis, electroenzymatic systems, flavin nucleotides, batosomes

### FUNDING

The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030) (№122030100168-2).

Received: 09.01.2023, revised: 02.02.2024, accepted: 05.02.2024