

К 80-летию института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

ОБЗОР

## НОВЫЕ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ЭЛЕКТРОАНАЛИЗА КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ, ИМЕЮЩИХ МЕДИЦИНСКУЮ ЗНАЧИМОСТЬ

*В.В. Шумянцева<sup>1\*</sup>, Л.Е. Агафонова<sup>1</sup>, Т.В. Булко<sup>1</sup>, П.И. Королева<sup>1</sup>, А.В. Кузиков<sup>2</sup>, Р.А. Масамрех<sup>2</sup>, Т.А. Филиппова<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10; \*e-mail: viktorina.shumyantseva@ibmc.msk.ru

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Обзор посвящён новым высокоэффективным методам анализа каталитической активности ферментов, имеющих медицинскую значимость, таких как цитохромы P450, трипсин, аспарагиназа, бета-лактамаза, нуклеазы. Методы основаны на регистрации специфической активности ферментов с помощью электроаналитических технологий. В обзоре проанализированы экспериментальные данные, полученные авторами. Разработаны две платформы, позволяющие количественно измерять каталитическую активность на основе электрохимических свойств фермента (цитохромы P450, бактосомы, аспарагиназа) или субстрата (трипсин, нуклеазы, рестриктазы, бета-лактамаза).

**Ключевые слова:** ферменты; субстраты; ингибиторы; ферментативный катализ; электрохимический анализ

**DOI:** 10.18097/BMCRM00225

### ВВЕДЕНИЕ

Ферменты широко используются в качестве катализаторов в промышленности, при утилизации отходов в полезные конечные продукты или экологически чистые заменители, улучшении сырья, а также как катализаторы биосинтетических реакций, для получения различных соединений, включая стереоспецифическую биоконверсию [1, 2]. Ферменты используются в клинико-диагностических лабораториях для диагностики заболеваний [3, 4]. В связи с этим, анализ каталитических и кинетических параметров ферментативных реакций, изучение механизма межлекарственных взаимодействий, выявление новых субстратов и ингибиторов, является актуальной и быстроразвивающейся областью биомедицины. В данном обзоре представлены разработанные авторами две платформы для электрохимического анализа каталитической активности ферментов, имеющих медицинскую значимость. Для исследования каталитической активности ферменты (цитохромы P450 и аспарагиназа) были иммобилизованы на рабочей поверхности электродов. Иммобилизация субстратов на электроде была использована для регистрации каталитических свойств трипсина, бета-лактамазы, а также нуклеаз и рестриктаз (рис. 1).

### 1. АНАЛИЗ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОВ P450 ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

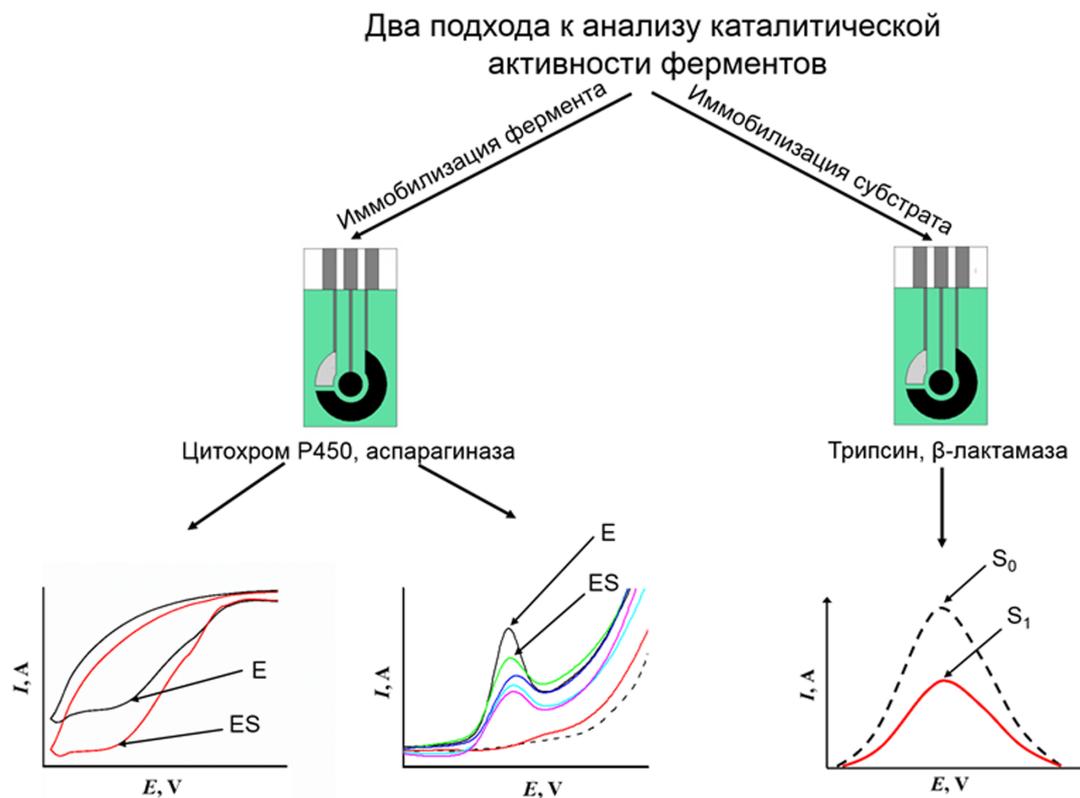
Так как цитохромы P450 метаболизируют многочисленные эндогенные соединения и ксенобиотики, анализ каталитической активности этого класса гемопротеинов имеет диагностическое значение [6–11].

Для исследования каталитической активности цитохромов P450 разработаны методы электрохимического анализа этих гемопротеинов. При иммобилизации ферментов на электроде происходит перенос электронов от электрода к простетической группе фермента (гему). Электрохимическое восстановление цитохромов P450 может служить заменой природным донорам электронов NADPH или NADH [12–16]. Электрохимические системы на основе цитохромов P450 являются эффективными неинвазивными моделями для исследования субстратной специфичности этого класса гемопротеинов, при поиске новых лекарственных препаратов, анализе межлекарственных взаимодействий, регуляции активности полиморфных модификаций цитохромов P450 с помощью препаратов-корректоров.

#### 1.1. Поиск ингибиторов цитохромов P450 среди новых химических соединений

Цитохром P450 17A1 (CYP17A1) катализирует реакцию 17 $\alpha$ -гидроксилирования прегненолона и прогестерона с образованием соответствующих производных (являющихся предшественниками как половых, так и кортикостероидных гормонов) и последующую 17,20-лиазную реакцию, приводящую к образованию андрогенов — дегидроэпиандростерона и андростендиона. Одной из стратегий фармакотерапии рака предстательной железы является снижение уровня андрогенов за счёт использования ингибиторов CYP17A1 — ключевого фермента биосинтеза андрогенов. С помощью разработанной электрохимической системы на основе CYP17A1, был проведён скрининг ингибиторной активности новых оксазолиновых производных [17(20)E]-прегнена (получены в лаборатории синтеза физиологически



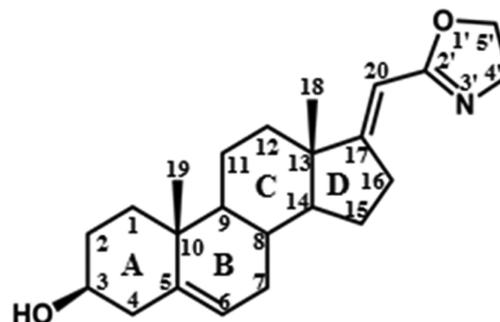


**Рисунок 1.** Иммобилизация ферментов или субстратов на электродах для исследования каталитической активности.

активных соединений ИБМХ), различающихся структурой оксазолинового и стероидного фрагментов. Среди оксазолиновых производных [17(20)*E*]-прегнена выявлены эффективные ингибиторы электрокаталитической активности CYP17A1 (рис. 2), перспективные в качестве потенциальных лекарственных препаратов для лечения рака предстательной железы [17, 18]. Показано, что эффективность ингибирования электрокаталитической активности CYP17A1 зависит как от структуры, так и от относительной гидрофобности молекулы ингибитора.

### 1.2. Влияние метаболических антиоксидантных препаратов на каталитическую активность цитохромов P450

Разработанные электрохимические системы на основе цитохрома P450 3A4 (CYP3A4) и цитохрома P450 2C9 (CYP2C9) были использованы для исследования влияния антиоксидантных метаболических препаратов, применяемых в клинической практике (аскорбиновая кислота, восстановленный глутатион (GSH), таурин, цитохром *c* (cyt *c*), этилметилгидроксипиридина малат (этоксидол)), на каталитическую активность этих изоферментов. Полученные с помощью разработанных электрохимических систем на основе CYP3A4 и CYP2C9 экспериментальные данные о влиянии исследуемых соединений на каталитическую активность изоферментов цитохрома P450 свидетельствуют, что антиоксидантные препараты стимулируют электрохимическое восстановление и стабилизируют изоферменты цитохрома P450 путём



**Рисунок 2.** Структура соединения (2'-{[(*E*)-3β-гидроксиандрост-5-ен-17-илиден]метил}-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол), проявляющего наибольшую ингибиторную активность по отношению к CYP17A1 [17, 18].

уменьшения скорости накопления пероксида водорода, образующегося при разобщении каталитического цикла и при электрохимическом восстановлении кислорода [19–21]. Таким образом, антиоксидантные метаболические препараты могут использоваться в комплексной фармакотерапии с целью регуляции скорости метаболизма лекарственных препаратов, особенно при персонализированном подходе к лечению пациентов с полиморфизмом генов изоферментов цитохрома P450. Проведены исследования с участием добровольцев по анализу каталитической активности CYP3A4 на основе экспериментальной оценки соотношения 6β-гидроксикортизол/кортизол и влияния антиоксидантов на активность этого фермента, которые выявили влияние таурина на метаболизм кортизола, но отсутствие такового влияния у L-карнитина [22–24].

### 1.3. Межлекарственные взаимодействия (МЛВ)

Межлекарственные взаимодействия (МЛВ) — серьёзная проблема современной медицины. МЛВ проявляются при одновременном приёме нескольких препаратов и связаны с взаимным влиянием как самих препаратов, так и их метаболитов на биотрансформацию. Это может привести к нарушению фармакологического действия, проявлению негативных побочных эффектов и изменению их свойств, а также к изменению диапазона эффективных концентраций (смещение “терапевтических окон”). Значительная часть побочных эффектов фармакотерапии обусловлена ингибированием цитохромов P450. В связи с этим, актуальны и востребованы адекватные модельные системы на основе цитохромов P450, метаболизирующих лекарственных средства, для исследования потенциальных МЛВ. В наших исследованиях с помощью разработанных электрохимических систем на основе клинически значимых цитохромов P450 был выявлен ряд МЛВ [25–28].

Было исследовано взаимодействие ингибитора протонного насоса омепразола и макролидного бактериостатического антибиотика эритромицина, метаболизируемых CYP3A4. Взаимное влияние этих лекарственных средств на CYP3A4 выражается в снижении скорости реакции N-деметилирования эритромицина в присутствии омепразола, но в отсутствие влияния эритромицина на метаболические превращения омепразола [25].

Субстрат CYP3A4 — противоопухолевый препарат абиратерон — одновременно является конкурентным ингибитором эритромицин N-деметилазной активности этого фермента ( $K_i = 8.1 \pm 1.2$  мкМ), при этом эритромицин не ингибировал активность CYP3A4 по отношению к абиратерону [27]. С помощью электрохимической системы были выявлены ингибирующие свойства абиратерона по отношению к (S)-напроксен O-деметилазной активности CYP2C9; при этом фармакологически активный 3-кето-Δ4-метаболит абиратерона (D4A), перспективный в качестве нового противоопухолевого агента, проявлял менее выраженные ингибиторные свойства по отношению к ферменту по сравнению с абиратероном [28].

### 1.4. Электроанализ полиморфных модификаций CYP2C9, 2C9\*2 и 2C9\*3 и исследование их каталитических свойств в присутствии антиоксидантных метаболитических препаратов

Изменения каталитических свойств цитохромов P450 вследствие полиморфизма их генов являются причиной многих нежелательных побочных проявлений лекарственных препаратов. В связи с этим исследование особенностей каталитической активности полиморфных вариантов цитохромов P450 является актуальным. Исследованы электрохимические свойства CYP2C9 и полиморфных форм CYP2C9\*2 (замена аргинина в 144 положении на цистеин) и CYP2C9\*3 (замена изолейцина в 359 положении на лейцин). Для целенаправленной

регуляции биотрансформации лекарств *in vivo* может быть реализован подход с помощью коррекции собственной активности фермента. В связи с этим актуальным и важным подходом является регуляция ферментативной активности с помощью соединений, не являющихся субстратами этого гемопroteина, но оказывающих влияние на отдельные стадии катализа. Ранее были исследованы антиоксидантные метаболитические препараты и витамины-антиоксиданты в качестве корректоров каталитических процессов цитохромов P450. Такие препараты стимулируют процесс электрохимического восстановления иона железа гема CYP3A4, CYP2C9 и цитохрома P450 2D6 (CYP2D6), регистрируемый по возрастанию амплитуды катодного тока при соответствующем потенциале. Препараты, обладающие антиоксидантными свойствами, мексидол (этилметилгидроксипиридина сукцинат) и таурин стимулировали не только стадию восстановления цитохромов P450 2C9, P450 2C9\*2 и P450 2C9\*3, но и проявили активирующее действие на каталитическую активность цитохромов P450 2C9, 2C9\*2 и 2C9\*3 по отношению к субстрату диклофенаку [29]. В присутствии мексидола, метаболитического антиоксидантного препарата, регистрируется повышение каталитической активности CYP2C9 по отношению к диклофенаку в 1.7 раза. Таурин, витаминоподобное соединение с антиоксидантными свойствами, также стимулирует метаболизм диклофенака в 1.5 раза.

### 1.5. Биэлектродные электрохимические системы для определения активности цитохромов P450

Основываясь на различии электрохимических свойств ряда субстратов и продуктов реакций, мы предложили концептуально новый подход для определения каталитической активности цитохромов P450, основанный на использовании биэлектродных электрохимических систем. Один из электродов биэлектродной системы (ферментный) используется для иммобилизации рекомбинантных или мембраносвязанных изоформ цитохрома P450, при этом другой электрод (индикаторный) служит для регистрации уменьшения количества субстрата или прироста продукта реакции за счёт прямого электрохимического окисления этих соединений. Основным достоинством такого подхода для определения кинетических параметров фермента является отсутствие необходимости использования NADPH как источника электронов и NADPH-регенерирующей системы, поскольку реакции инициируются электронами с электрода, а также разделения реакционной смеси после проведения ферментативной реакции в случае перекрывающихся потенциалов окисления субстрата и продукта. Использование взаимозаменяемых электродов, получаемых методом трафаретной печати (печатных электродов, ПГЭ), с диаметром графитового рабочего электрода 2–4 мм как для иммобилизации ферментов, так и для определения образующихся продуктов позволяет миниатюризировать процесс определения активности цитохромов P450. На рисунке 3 представлен принцип биэлектродных

электрохимических систем для определения активности цитохромов P450. Использование двух диапазонов потенциалов позволяет регистрировать как электрокаталитическую активность цитохромов P450, так и электроокисление лекарства. Метод востребован для анализа и сравнительной оценки каталитических свойств цитохромов P450 при выделении экспрессированных ферментов, модифицированных ферментов, для анализа межлекарственных взаимодействий, для исследования особенностей генетического полиморфизма.

Разработаны биэлектродные электрохимические системы для определения гидроксильной активности CYP3A4 и CYP2C9 по отношению к диклофенаку, основанные на электрохимической регистрации убыли субстрата [30], а также системы, основанные на регистрации прироста продукта, для определения активностей CYP2C9 по отношению к (*S*)-варфарину [31], диклофенаку [32] и (*S*)-напроксену [33], CYP2C19 по отношению к фенитоину [34], CYP2E1 по отношению к хлорзоксазону [35], CYP19A1 по отношению к его природным субстратам — андростендиону и тестостерону [36]. Для разработанных систем были

определены пределы определяемых концентраций продуктов реакций, а также параметры стационарной кинетики иммобилизованных на электроде ферментов (табл. 1). Возможность успешного применения разработанных систем для ингибиторного анализа цитохромов P450 была показана нами на примере сульфафеназола, являющегося известным ингибитором CYP2C9, флуконазола, ингибирующего активность CYP2C19, а также на примере механизм-активируемого ингибирования CYP19A1 эземестаном. Важно отметить, что использование *in vitro* систем, в том числе электрохимических, позволяет смоделировать цитохром P450-зависимый метаболизм лекарственных препаратов. Корреляция между клиренсами *in vitro* и *in vivo* позволяет прогнозировать фармакокинетику и оценить дозировку препарата [37].

Одним из основных направлений современного биосенсорного электрохимического анализа является улучшение аналитических свойств электродов, использующихся для количественного определения аналитов, в том числе за счёт использования углеродных наноматериалов [38]. В наших исследованиях на примере электрохимической системы

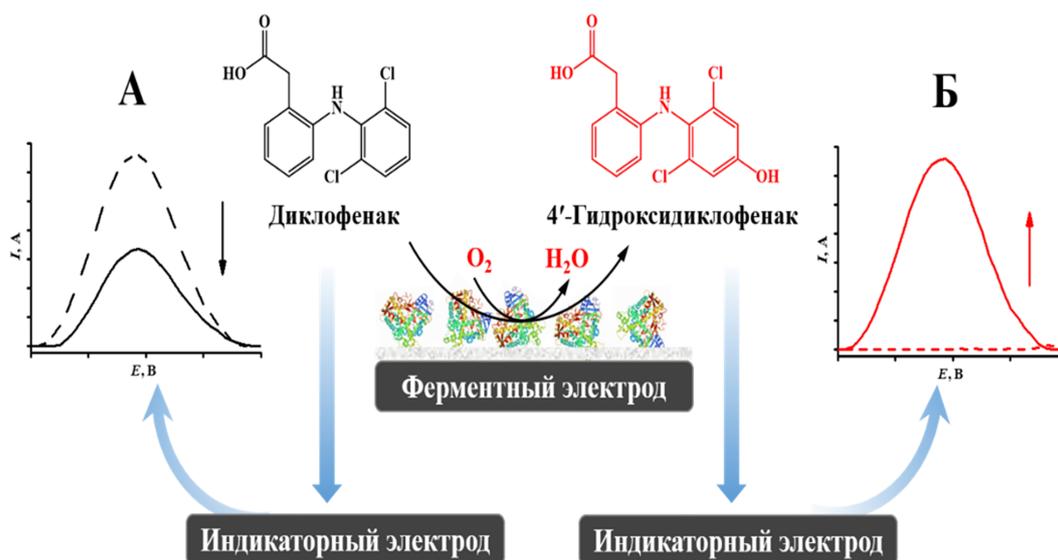


Рисунок 3. Двухэлектродная система для регистрации субстратов или метаболитов цитохром P450-зависимых реакций.

Таблица 1. Определение активности цитохромов P450 методом электрохимического анализа продуктов реакций

Фермент	Субстрат	Продукт	Предел определяемых концентраций продукта, нМ	$V_{\max}$ , мин <sup>-1</sup>	$K_M$ , мкМ	$V_{\max}/K_M$ , мин <sup>-1</sup> /мкМ
CYP2C9	( <i>S</i> )-Варфарин*	( <i>S</i> )-7-Гидроксиварфарин	91	0.100±0.002	3.03±0.38	0.0330
CYP2C9	Диклофенак*	4'-Гидроксидиклофенак	85	5.350±0.130	11.66 ± 0.92	0.4600
CYP2C9	( <i>S</i> )-Напроксен	( <i>S</i> )-Десметилнапроксен	290	0.980±0.030	331,00±30,00	0.0030
CYP2C19	Фенитоин	4-Гидроксифенитоин	40	0.094±0.002**	25.80±2.00**	0.0036
CYP2E1	Хлорзоксазон*	6-Гидроксихлорзоксазон	110	1.640±0.080	78,00±9,00	0.0210
CYP19A1	Андростендион*	Эстрон	11	51.600±4.200	4.20±1.50	12.2900
CYP19A1	Тестостерон*	β-Эстрадиол	3.4	10.200±1.200	3.80±1.30	2.6800

Примечание: \* маркерный субстрат, \*\* значения  $V_{\max}$  и  $K_M$  рассчитаны для высокоаффинной формы CYP2C19 в соответствии с уравнением бифазной кинетики.

для определения активности CYP2C9 по отношению к диклофенаку мы показали, что использование одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ) для модификации индикаторных электродов для количественного определения продукта реакции 4'-гидроксидиклофенака за счёт его электрохимического окисления позволяет снизить предел определяемых концентраций в 1.4 раза и увеличить чувствительность почти в 37 раз по сравнению с немодифицированными электродами [32].

Таким образом, разработанные нами биелектродные электрохимические системы могут успешно использоваться для решения задач фармакологии, связанных с выявлением межлекарственных взаимодействий, обусловленных ингибированием индивидуальных изоформ цитохрома P450.

#### 1.6. Методы повышения каталитической активности цитохромов P450 в электрохимических системах

Повышение эффективности электрокатализа имеет значение для скрининга субстрат/ингибиторного потенциала цитохромов P450, так как позволит регистрировать каталитические процессы с большей чувствительностью. Кроме того, производительные электрокаталитические системы востребованы для создания биореакторов, а также для детоксикации токсичных органических соединений — субстратов этого класса гемопротеинов.

Для повышения эффективности электрокатализа цитохромов P450 разработаны подходы, в основе которых лежит механизм каталитического действия этого класса гемопротеинов и моделирование электрон-транспортной цепи монооксигеназной системы [40–43]: образование продуктивного фермент-субстратного комплекса, оптимизация электрон-транспортной цепи при включении

флавиновых нуклеотидов в качестве участников цепи переноса электронов на электроде, модификация поверхности электродов трёхмерными неорганическими структурами для перехода от 2Д к 3Д режиму с использованием пористых мембран на основе анодного оксида алюминия, содержащих сонаправленные поры диаметром 0.1 мкм и 0.2 мкм. Ферментативные реакции в “замкнутых” пространствах (нанопорах, наноканалах, мицеллах, обращённых мицеллах) моделируют природные системы, в которых ферменты заключены в ограниченный объём и микроокружение, подобное клеточному (эффект молекулярного краудинга) (рис. 4).

Наряду с созданием электрохимических систем на основе рекомбинантных цитохромов P450, интенсивное развитие получили электрохимические системы на основе иммобилизованных на электродах микросом человека либо микросом, полученных из трансгенных организмов, например, из клеток насекомых, трансфицированных бакуловирусом, несущим гены индивидуальных изоферментов цитохрома P450 человека и цитохром P450-редуктазы (Vaculosomes™, Supersomes™) или мембранных фракций, полученных из *Escherichia coli*, продуцирующих индивидуальные изоферменты цитохрома P450 и компоненты монооксигеназной системы человека (Vactosomes®). Преимуществом таких систем является отсутствие необходимости выделения цитохрома P450 из мембранного микроокружения, что позволяет избежать инактивации фермента. В отличие от рекомбинантных форм ферментов, которые при адсорбции на немодифицированных электродах могут терять стабильность и активность, иммобилизация мембраносвязанных форм цитохромов P450 может препятствовать потере каталитической активности [35, 37, 44, 45].

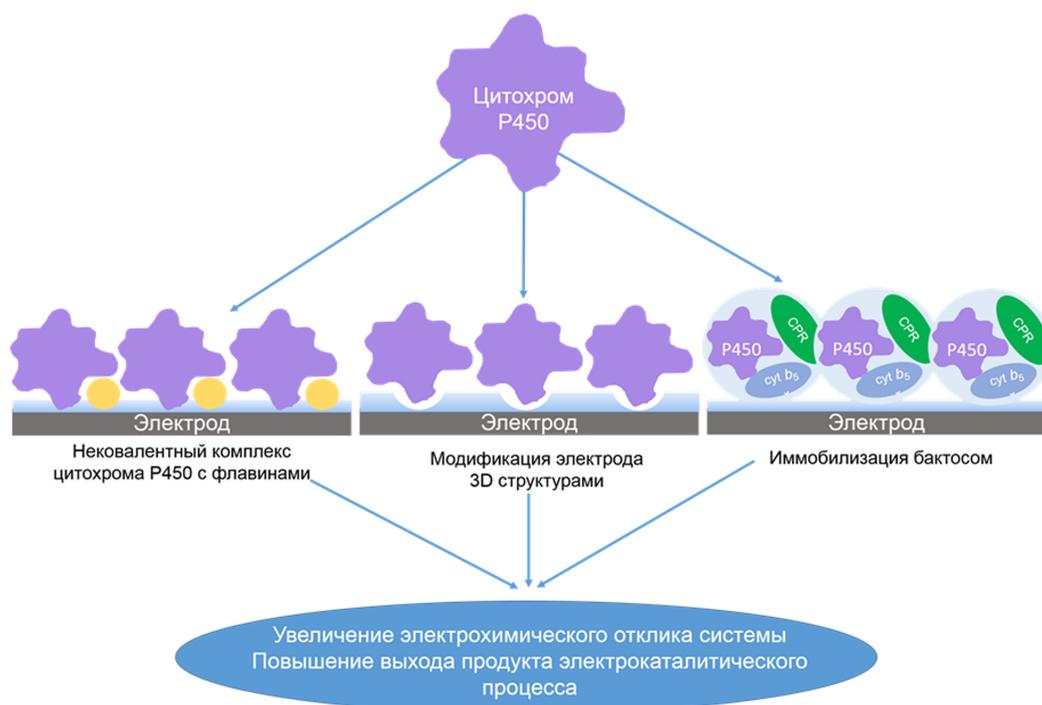


Рисунок 4. Методы повышения каталитической активности цитохромов P450 в электрохимических системах.

Электрокаталитическая активность СУР2Е1 в составе бактосом по отношению к хлорзоксазону была определена с помощью биэлектродной системы для определения продукта ферментативной реакции 6-гидрокси-хлорзоксазона [35]. Один из электродов системы был использован для иммобилизации коммерчески доступных бактосом, представляющих собой мембранную фракцию, полученную из *E. coli*, продуцирующей СУР2Е1 человека, цитохром Р450 редуктазу (CPR) и обогащённую цитохромом  $b_5$  (сyt  $b_5$ ). Второй электрод системы был использован для количественного определения методом квадратно-волновой вольтамперометрии 6-гидрокси-хлорзоксазона за счёт его прямого электрохимического окисления. Чувствительность метода определения 6-гидрокси-хлорзоксазона составила 0.016 мкА/мкМ, предел определяемых концентраций 6-гидрокси-хлорзоксазона — 0.11 мкМ. С помощью разработанной системы рассчитаны параметры стационарной кинетики реакции гидроксирования хлорзоксазона при участии СУР2Е1 в составе бактосом, иммобилизованных на электроде: максимальная скорость реакции ( $V_{\max}$ ) 1.64±0.08 М/мин/(М фермента) и значение константы Михаэлиса  $K_M$  78±9 мкМ. Мы также детально исследовали электрохимические свойства бактосом, иммобилизованных на электроде, и показали, что перенос электронов с электрода происходит как на флавиновые простетические группы CPR, так и на ион железа гема СУР2Е1 и сyt  $b_5$ . Кроме того, мы показали, что CPR может активировать электрокаталитическую активность СУР2Е1 по отношению к хлорзоксазону, по-видимому, за счёт межмолекулярного переноса электронов от электрохимически восстановленной формы CPR к иону железа гема СУР2Е1. Разработанная биэлектродная система может использоваться при решении задач фармакологии, связанных с определением активности СУР2Е1.

Был проведён сравнительный анализ каталитической активности СУР3А4 и СУР3А4 в составе бактосом по отношению к субстрату диклофенаку. Для анализа процесса гидроксирования диклофенака был использован подход, основанный на регистрации уменьшения концентрации субстрата в ходе каталитической реакции [30]. Значение каталитической константы ( $k_{\text{cat}}$ ) для фермента в составе бактосом, иммобилизованных на электроде, было примерно в 3.5 раза выше (17.59±2.73 мин<sup>-1</sup>), чем для иммобилизованного рекомбинантного фермента (4.98±0.48 мин<sup>-1</sup>).

## 2. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA*

L-аспарагиназы (амидогидролазы) — это ферменты, которые катализируют реакцию гидролиза L-аспарагина (L-Asn) с образованием L-аспарагиновой кислоты (L-Asp) и аммиака. Истощение пула аспарагина приводит к ингибированию биосинтеза белка и апоптозу лимфобластных клеток, которым

требуется Asn из внешних источников [46]. L-аспарагиназы используются при лечении острого лимфобластного лейкоза. [47]. L-аспарагиназы могут быть использованы не только в терапии лейкемии, но и при лечении других типов опухолей [48]. Электрохимический анализ L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* был проведён при иммобилизации фермента на поверхности электрода, модифицированного ОУНТ [49]. При взаимодействии с субстратом L-аспарагином регистрируется снижение максимальной амплитуды тока электрохимического окисления аминокислотных остатков, входящих в активный центр фермента при потенциале 0.593±0.007 В (отн. Ag/AgCl). Тир29 является важнейшей аминокислотой в активном центре бактериальных L-аспарагиназ, участвует в связывании субстрата и высвобождении продукта реакции [47]. Концентрационно-зависимое снижение амплитуды тока, соответствующего электрохимическому окислению аминокислот фермента при взаимодействии с L-аспарагином, позволило рассчитать электрохимическую константу Михаэлиса  $K_M$  как 600±70 мкМ [49]. В аналогичных условиях в присутствии глицина не было зарегистрировано снижение амплитуды тока, соответствующей электроокислению аспарагиназы, что подтверждает специфичность разработанного метода анализа каталитической активности L-аспарагиназы *E. carotovora*.

## 3. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАЗ, ОСНОВАННЫЕ НА ЭЛЕКТРООКИСЛЕНИИ ОСТАТКОВ АМИНОКИСЛОТ МОДЕЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ

Изучение протеаз является актуальным направлением в медицине и биотехнологии. Протеазы участвуют во многих физиологических процессах в организме человека в норме, а также в развитии различных патологических состояний, таких как онкологические, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, воспалительные заболевания [50, 51]. В связи с этим данная группа ферментов рассматривается в качестве фармакологических мишеней, диагностических маркеров или лекарственных препаратов [50–52]. Бактериальные и вирусные протеазы являются мишенями для разрабатываемых антибиотиков и противовирусных препаратов, позволяющих избежать резистентности к препаратам при терапии бактериальных и вирусных инфекций [52–54]. В связи с функциональной значимостью протеаз разработано большое количество систем для определения их активности, основанных на оптических, иммунологических, калориметрических, масс-спектрометрических и электрохимических методах [55].

Ряд аминокислот (тирозин, триптофан, цистеин, гистидин, метионин) может подвергаться необратимому электрохимическому окислению, регистрируемому электрохимическими методами [56–60]. Введение

остатков электроактивных аминокислот в состав пептидного субстрата может быть использовано для определения протеазной активности. На основе предложенного подхода разработана электрохимическая система для определения протеазной активности трипсина, основанная на регистрации снижения площади пика электроокисления остатка тирозина вследствие протеазного расщепления модельных пептидов, иммобилизованных на поверхности печатных графитовых электродов, модифицированных наночастицами золота (ПГЭ/AuНЧ) [61]. Принцип работы предложенной электрохимической системы представлен на рисунке 5.

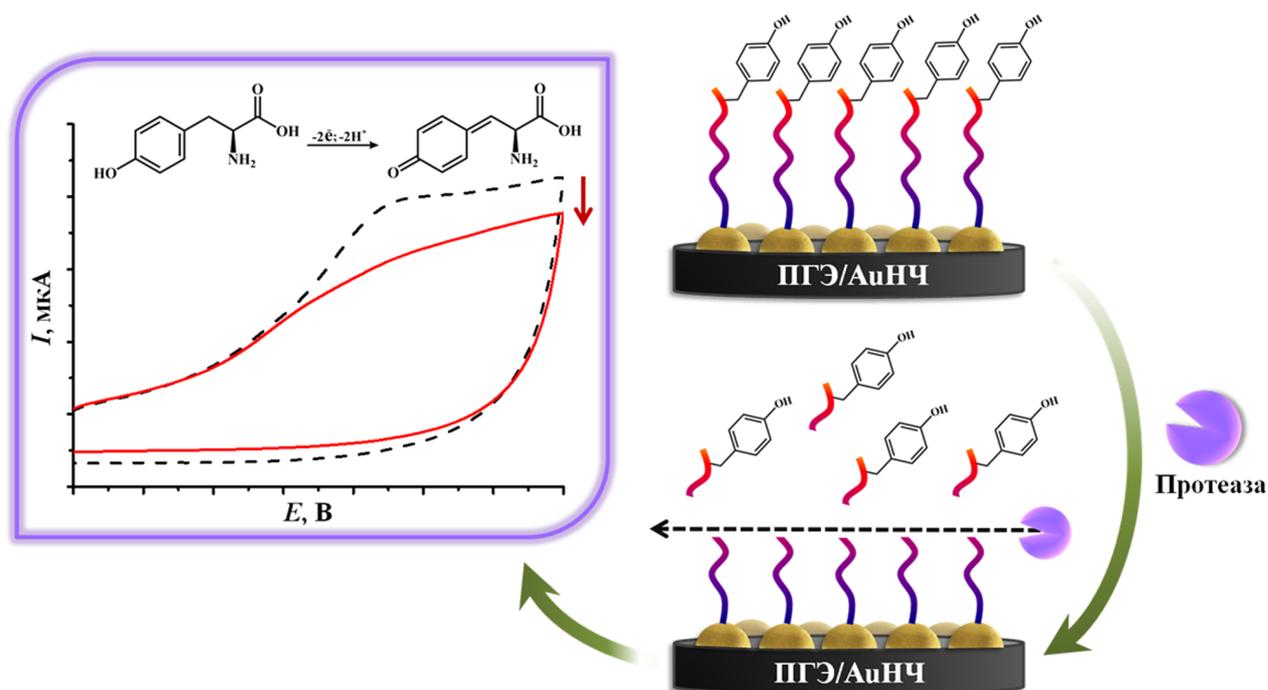
Аминокислотная последовательность пептида CGGGRYR содержала N-концевой остаток цистеина для иммобилизации на поверхности ПГЭ за счёт образования стабильной химической связи с AuНЧ, три остатка глицина, выполняющие роль спейсера, сайт специфического расщепления трипсином, представленный остатком аргинина, а также остаток тирозина, необходимый для регистрации активности трипсина. После инкубации пептида CGGGRYR в присутствии различных концентраций трипсина наблюдалось зависимое от времени расщепление модельного пептида с образованием связанного с ПГЭ/AuНЧ пентапептида (CGGGR) и свободного дипептида (YR), что регистрировалось по снижению значения площади пика электрохимического окисления остатка тирозина методом циклической вольтамперометрии. Из экспериментальных данных были получены параметры стационарной кинетики трипсина по отношению к пептиду CGGGRYR —  $k_{\text{cat}}$ ,  $K_M$  и эффективность катализа ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ), которые были рассчитаны как  $0.33 \pm 0.01 \text{ мин}^{-1}$ ,  $198 \pm 24 \text{ нМ}$  и  $0.0016 \text{ мин}^{-1}/\text{нМ}$  соответственно.

При этом значения  $k_{\text{cat}}$  и  $K_M$  оказались сопоставимы с таковыми, полученными с помощью других электрохимических систем [62, 63]. Значение предела определяемых концентраций для трипсина было определено как 22 нМ.

Предложенный нами подход является универсальным и может быть использован для изучения свойств других протеаз.

#### 4. ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ $\beta$ -ЛАКТАМАЗЫ СТХ-М-116

Анализ каталитической активности  $\beta$ -лактамаз необходим для поиска новых антибиотиков — субстратов этого фермента, а также для поиска новых ингибиторов данных ферментов для подавления антибиотикорезистентности бактериальных патогенов и повышения эффективности существующих  $\beta$ -лактамных антибиотиков [64]. Предложен новый подход, основанный на использовании электродов, модифицированных углеродными наноматериалами, для определения ферментативной активности и скрининга ингибиторов сериновых  $\beta$ -лактамаз — ферментов, ответственных за развитие антибиотикорезистентности патогенных бактерий к бета-лактамным антибиотикам. Антибиотик цефалоспоринового ряда цефотаксим эффективно регистрируется при потенциале  $0.596 \pm 0.625 \text{ В}$  (отн. Ag/AgCl). Это позволяет определять изменение его концентрации в растворе в результате гидролиза, катализируемого сериновой  $\beta$ -лактамазой. С помощью анализа электрохимических характеристик реакции окисления цефотаксима определены кинетические параметры его гидролиза, катализируемого сериновой  $\beta$ -лактамазой СТХ-М-116, относящейся к  $\beta$ -лактамазам расширенного



**Рисунок 5.** Принцип электроанализа протеаз на основе гидролиза пептидов, содержащих остаток электроактивной аминокислоты тирозина.

спектра (БЛРС).  $K_M$  составила 50 мкМ, максимальная скорость каталитической реакции  $1.67 \times 10^{-6}$  М/мин. При ингибировании  $\beta$ -лактамазы сульбактамом ( $IC_{50} = 2.5$  мкМ) каталитическая реакция гидролиза цефотаксима не регистрируется. Предложенный подход перспективен для скрининга новых субстратов и ингибиторов  $\beta$ -лактамаз.

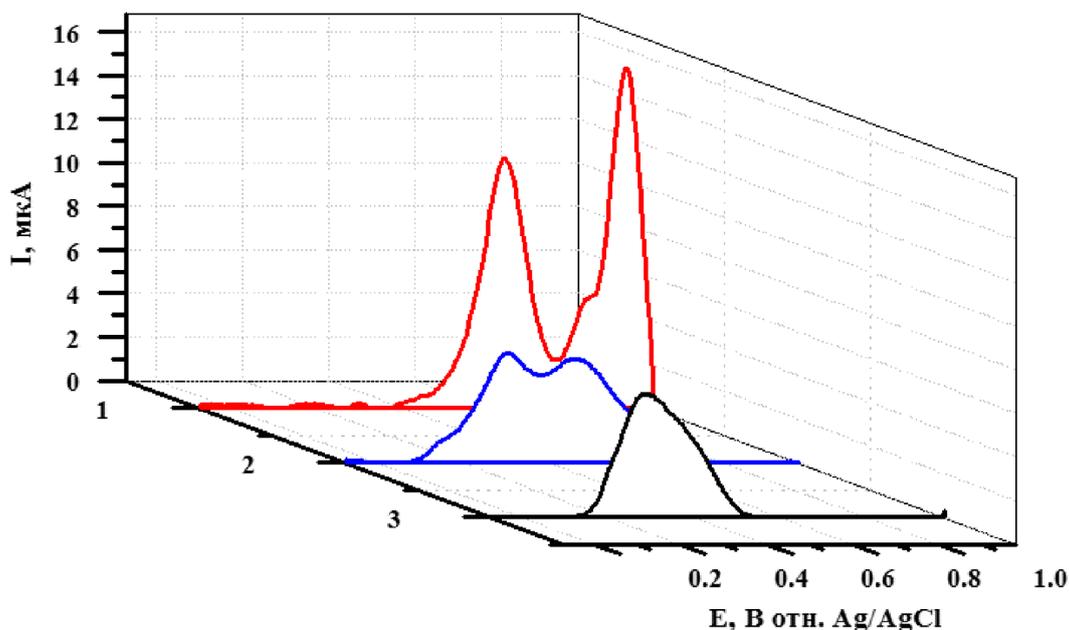
## 5. МЕТОДЫ ЭЛЕКТРОАНАЛИЗА АКТИВНОСТИ РЕСТРИКТАЗ И НУКЛЕАЗ

Нуклеазы — ферменты класса гидролаз, способные расщеплять ДНК на моно- или олигонуклеотидные фрагменты. Расщепление ДНК эндонуклеазами или экзонуклеазами играет фундаментальную роль в репликации, рекомбинации, репарации ДНК, молекулярном клонировании и генотипировании [65–67]. Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) способны находить участки ДНК, в которых может быть локализована мутация, и расщеплять их. По количеству и длине фрагментов ДНК, полученных после действия рестриктаз, можно судить о наличии или отсутствии мутаций в исследуемом гене. Поэтому разработка новых высокочувствительных методов оценки активности ферментов рестрикции является первостепенной задачей. Традиционные методы, такие как гель-электрофорез, радиоактивное мечение, высокоэффективная жидкостная хроматография и иммуноферментный анализ (ИФА), используются для определения активности нуклеаз, но имеют ряд ограничений (необходимость применения дополнительных реагентов, введение радиоактивной метки).

Потенциометрический метод измерения активности нуклеаз и окислительного повреждения ДНК в гомогенном растворе основан на взаимодействии ДНК как полианиона с модифицированным поликатионом протамином мембранного электрода. Пределы обнаружения составили  $2.7 \times 10^{-4}$  Ед/мкл для нуклеазы S1 и  $3.9 \times 10^{-4}$  Ед/мкл для ДНКазы I [67]. Однако потенциометрический метод не позволяет зарегистрировать основания ДНК и сделать вывод о специфике взаимодействия.

Нами был разработан электрохимический метод оценки активности эндонуклеаз и фрагментации ДНК с использованием электродов, модифицированных углеродными нанотрубками [68]. Сравнительный анализ электрохимических профилей кольцевой плазмиды pTagGFP2-N в её нативном сверхспиральном состоянии и плазмид, расщепленных специфическими и неспецифическими эндонуклеазами рестрикции на 4 части и на низкомолекулярные фрагменты длиной 3–70 пар нуклеотидов, выявил существенные различия в их электрохимическом поведении. Были использованы неспецифическая эндонуклеаза I SE-E323 и рестриктазы BstMC I (SE-E071), AluB I (SE-E549). При использовании метода дифференциально-импульсной вольтамперометрии показано, что с увеличением степени фрагментации ДНК увеличивается количество регистрируемых пиков, соответствующих электроокислению гетероциклических оснований, и растёт интенсивность максимальной амплитуды тока сигналов электроокисления (рис. 6).

В случае кольцевой плазмидной ДНК гетероциклические основания были встроены в более компактную кольцевую структуру и в меньшей степени соприкасались с поверхностью



**Рисунок 6.** Дифференциально-импульсные вольтамперограммы нативной плазмидной ДНК (—, 3 профиль), ДНК после воздействия специфической рестриктазы BstMC I (—, на 4 фрагмента, 2 профиль) и неспецифической эндонуклеазы (—, на низкомолекулярные 3–70 мерные фрагменты, 1 профиль). С увеличением степени фрагментации ДНК увеличивается количество регистрируемых пиков, соответствующих электроокислению гетероциклических оснований, и растёт интенсивность максимальной амплитуды тока сигналов электрохимического окисления гетероциклических оснований.

электрода, поэтому наблюдался один широкий пик при  $0.50 \pm 0.01$  В (отн. Ag/AgCl) по сравнению с ДНК, фрагментированной на 4 части. Электрохимический профиль фрагментированной на 4 части ДНК имел два пика при потенциалах  $0.50 \pm 0.01$  В (отн. Ag/AgCl) и  $0.70 \pm 0.01$  В (отн. Ag/AgCl) соответственно. Профиль расщеплённой неспецифической эндонуклеазой ДНК также содержал два смещённых по потенциалам пика электроокисления при  $0.50 \pm 0.01$  В (отн. Ag/AgCl) и  $0.70 \pm 0.01$  В (отн. Ag/AgCl) гетероциклических оснований с большей интенсивностью максимальной амплитуды токов. При частичной или полной фрагментации или деградации ДНК, индуцированной специфическими и неспецифическими эндонуклеазами рестрикции, возрастает количество олигонуклеотидных фрагментов. Это приводит к возрастанию как интенсивности сигналов, так и количеству пиков, соответствующих регистрируемым гетероциклическим основаниям за счёт повышения доступности повреждённой ДНК для электронов, что косвенно отражает активность ферментов рестрикции. Разработанный подход эффективен для высокопроизводительного скрининга ДНК-гидролаз и для регистрации эффективности процессов целевой фрагментации ДНК с чувствительностью до 10 нг/мкл. Были проанализированы образцы ДНК, выделенной из клеток линии K562 на ранних и поздних стадиях апоптоза. Результаты анализа показали, что на более поздних стадиях апоптоза возрастает интенсивность сигналов ДНК, свидетельствующая о процессе фрагментации как маркера клеточной гибели. Использование фрагментации ДНК в качестве маркера программируемой клеточной гибели позволяет регистрировать ранний и поздний апоптоз в клетках млекопитающих.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Арсенал методов регистрации каталитической активности ферментов весьма широк. Однако в связи с функциональной активностью ферментов как биокатализаторов, терапевтических средств заместительной терапии, диагностических компонентов и маркеров заболеваний, разрабатываются новые более чувствительные и более технологичные методы анализа биомолекул с каталитической активностью и имеющих медицинскую значимость, таких как цитохромы P450, трипсин, аспарагиназа, бета-лактамаза, рестриктазы, неспецифические нуклеазы. Электрохимические методы для регистрации каталитической активности отвечают современным требованиям анализа, таким как высокая чувствительность, экспрессность, а также возможность прямой регистрации биохимического события (собственно каталитической реакции). Разработанные методы не требуют дополнительных реагентов или субстратов, меченных флуоресцентными или радиоактивными метками, а также использования электроактивных электролитов и медиаторов электронного транспорта (например, феррицианид калия, ферроценкарбоновая кислота, координационные соединения кобальта), которые могут повлиять

на каталитическую активность биокатализатора. Разработаны две электрохимические платформы, позволяющие количественно измерять каталитическую активность на основе электрохимических свойств фермента (цитохромы P450, бактосомы, аспарагиназа) или субстрата (трипсин, нуклеазы, рестриктазы, бета-лактамаза). Для ферментов, имеющих в составе простетическую электроактивную группу (гемопротеины цитохромы P450) анализ основан на регистрации именно изменений электрохимических параметров гема при взаимодействии с субстратами. Если фермент не содержит электроактивную простетическую группу, метод регистрации основан на способности аминокислот полипептидной цепи электрохимически окисляться при положительных значениях потенциалов. В случае электроактивных субстратов или продуктов реакций (пептиды, лекарственные препараты) регистрации активности фермента возможна за счёт количественного определения убыли субстрата или прироста продукта под воздействием биокатализатора.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## 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

1. *Shajhutdinova, Z., Pashirova, T., Masson, P.* (2022) Kinetic processes in enzymatic nanoreactors for *in vivo* detoxification. *Biomedicines*, **10**(4), 784. DOI: 10.3390/biomedicines10040784
2. *Pashirova, T., Shajhutdinova, Z., Mansurova, M., Kazakova, R., Shambazova, D., Bogdanov, A., Tatarinov, D., Daudé, D., Jacquet, P., Chabrière, E., Masson, P.* (2022) Enzyme nanoreactor for *in vivo* detoxification of organophosphates. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **14**(17), 19241–19252. DOI: 10.1021/acsami.2c03210
3. *Wohlgemuth, R.* (2021) Biocatalysis — key enabling tools from biocatalytic one-step and multi-step reactions to biocatalytic total synthesis. *New Biotechnol.*, **60**, 113–123. DOI: 10.1016/j.nbt.2020.08.006
4. *Singh, R.S., Singh, T., Singh, A.K.* (2019) Enzymes as Diagnostic Tools. In: *Advances in Enzyme Technology* (Singh, R.S., Singhanian, R.R., Pandey, A., Larroche, C., eds.), Elsevier, Netherlands, pp. 225–271. DOI: 10.1016/B978-0-444-64114-4.00009-1
5. *Zhao, W.W., Xu, J.J., Chen, H.Y.* (2017) Photoelectrochemical enzymatic biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, **92**, 294–304. DOI: 10.1016/j.bios.2016.11.009

6. Klyushova, L.S., Perepechaeva, M.L., Grishanova, A.Y. (2022) The role of CYP3A in health and disease. *Biomedicines*, **10**(11), 2686. DOI: 10.3390/biomedicines10112686
7. Li, Z., Jiang, Y., Guengerich, F.P., Ma, L., Li, S., Zhang, W. (2020) Engineering cytochrome P450 enzyme systems for biomedical and biotechnological applications. *J. Biol. Chem.*, **295**(3), 833–849. DOI: 10.1074/jbc.REV119.008758
8. di Nardo, G., Gilardi, G. (2020) Natural compounds as pharmaceuticals: The key role of cytochromes P450 reactivity. *Trends Biochem. Sci.*, **45**(6), 511–525. DOI: 10.1016/j.tibs.2020.03.004
9. Krishnan, S. (2020) Bioelectrodes for evaluating molecular therapeutic and toxicity properties. *Curr. Opin. Electrochem.*, **19**, 20–26. DOI: 10.1016/j.coelec.2019.09.004
10. Hryciay, E.G., Bandiera, S.M. (2012) The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.*, **522**(2), 71–89. DOI: 10.1016/j.abb.2012.01.003
11. 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
12. 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. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **158**, 116791. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116791
13. Schneider, E., Clark, D.S. (2013) Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, **39**, 1–13. DOI: 10.1016/j.bios.2012.05.043
14. Sun, X., Sun, J., Ye, Y., Ji, J., Sheng, L., Yang, D., Sun, X. (2023) Metabolic pathway-based self-assembled Au@MXene liver microsome electrochemical biosensor for rapid screening of aflatoxin B1. *Bioelectrochemistry*, **151**, 108378. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2023.108378
15. 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.*, **15**, 192–204. DOI: 10.1016/j.bios.2018.08.040
16. Kumar, N., He, J., Rusling, J.F. (2023) Electrochemical transformations catalyzed by cytochrome P450s and peroxidases. *Chem. Soc. Rev.*, **52**, 5135–5171. DOI: 10.1039/d3cs00461a
17. Kostin, V.A., Zolotsev, V.A., Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Shumyantseva, V.V., Veselovsky, A.V., Stulov, S.V., Novikov, R.A., Timofeev, V.P., Misharin, A.Y. (2016) Oxazolonyl derivatives of [17 (20) E]-21-norpregnene differing in the structure of A and B rings. Facile synthesis and inhibition of CYP17A1 catalytic activity. *Steroids*, **115**, 114–122. DOI: 10.1016/j.steroids.2016.06.002
18. Archakov, A.I., Lisitsa, A.V., Ipatova, O.M., Misharin, A.Yu., Stulov, S.V., Shishova, D.K., Shumyantseva, V.V., Kuzikov, A.V., Veselovsky, A.V. (2017) Pregn-17(20)-ene derivatives with antitumor activity, Russian State Patent Agency Certificate, No. 2617698 of 26.04.2017.
19. Makhova, A.A., Shumyantseva, V.V., Shikh, E.V., Bulko, T.V., Suprun, E.V., Kuzikov, A.V., Kukes, V.G., Archakov, A.I. (2013) Regulation of the activity of drug metabolism enzymes — cytochromes P450 3A4 and 2C9 by biologically active compounds. *Molekulyarnaya Meditsina*, **5**, 49–53.
20. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Suprun, E.V., Kuzikov, A.V., Agafonova, L.E., Archakov, A.I. (2015) Electrochemical methods for biomedical investigations. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **61**(2), 188–202. DOI: 10.18097/PBMC20156102188
21. Shumyantseva, V.V., Makhova, A.A., Bulko, T.V., Kuzikov, A.V., Shikh, E.V., Kukes, V.G., Archakov, A.I. (2015) Electrocatalytic cycle of P450 cytochromes: The protective and stimulating roles of antioxidants. *RSC Adv.*, **5**(87), 71306–71313
22. Shih, E.V., Fomin, E.V., Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V. (2012) Combined therapy of elderly patients with regard to drugs metabolism. *Klinicheskaya Gerontologiya*, **18**(3–4), 54–58.
23. Makhova, A.A., Shikh, E.V., Bulko, T.V., Sizova, Z.M., Shumyantseva, V.V. (2019) The influence of taurine and L-carnitine on 6  $\beta$ -hydroxycortisol/cortisol ratio in human urine of healthy volunteers. *Drug Metab. Pers. Ther.*, **34**(3), 20190013. DOI: 10.1515/dmpt-2019-0013
24. Makhova, A.A., Shikh, E.V., Bulko, T.V., Komissarenko, I.A., Sizova, Zh.M., Shumyantseva, V.V. (2020) Effects of taurine and L-carnitine on the activity of cytochrome P450 3A4 in volunteers. *Experimentalnaya i Klinicheskaya Farmakologiya*, **83**(2), 34–37. DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-2-34-37
25. 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. (2020) Modeling of drug-drug interactions between omeprazole and erythromycin in the cytochrome P450-dependent system *in vitro*. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **66**(3), 241–249. DOI: 10.18097/PBMC20206603241
26. 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 Metab. Pers. Ther.*, **37**(3), 241–248. DOI: 10.1515/dmpt-2021-0116
27. Masamrekh, R.A., Kuzikov, A.V., Shcherbakov, K.A., Veselovsky, A.V., Filimonov, D.A., Dmitriev, A.V., Zaviyalova, M.G., Archakov, A.I., Shumyantseva, V.V., Haurychenka, Y.I., Gilep, A.A., Shkel, T.V., Strushkevich, N.V., Usanov, S.A. (2020) *In vitro* interactions of abiraterone, erythromycin, and CYP3A4: Implications for drug-drug interactions. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **34**(1), 120–130. DOI: 10.1111/fcp.12497
28. Masamrekh, R.A., Kuzikov, A.V., Filippova, T.A., Sherbakov, K.A., Veselovsky, A.V., Shumyantseva, V.V. (2022) The interactions of abiraterone and its pharmacologically active metabolite D4A with cytochrome P450 2C9 (CYP2C9). *Biomeditsinskaya Khimiya*, **68**(3), 201–211. DOI: 10.18097/PBMC20226803201
29. 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**(2), 383. DOI: 10.3390/pr10020383
30. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Konyakhina, A.Y., Romanenko, I., Max, J.B., Köhler, M., Gilep, A.A., Usanov, S.A., Pergushov, D.V., Schacher, F.H., Sigolaeva, L.V. (2020) All-electrochemical nanocomposite two-electrode setup for quantification of drugs and study of their electrocatalytic conversion by cytochromes P450. *Electrochim. Acta*, **336**, 135579. DOI: 10.1016/j.electacta.2019.135579
31. 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. *J. Electroanal. Chem.*, **904**, 115937. DOI: 10.1016/j.jelechem.2021.115937
32. Kuzikov, A.V., Filippova, T.A., Masamrekh, R.A., Shumyantseva, V.V. (2022) Electroanalysis of 4'-hydroxydiclofenac for CYP2C9 enzymatic assay. *Electrocatalysis*, **13**(5), 630–640. DOI: 10.1007/s12678-022-00753-3
33. Filippova, T.A., Masamrekh, R.A., Shumyantseva, V.V., Khudoklinova, Y.Y., Kuzikov, A.V. (2023) Voltammetric analysis of (S)-O-desmethylnaproxen for determination of CYP2C9 demethylase activity. *BioNanoScience*, **13**(3), 1278–1288. DOI: 10.1007/s12668-023-01159-1

34. Kuzikov, A.V., Filippova, T.A., Masamrekh, R.A., Shumyantseva, V.V. (2022) Biotransformation of phenytoin in the electrochemically-driven CYP2C19 system. *Biophys. Chem.*, **291**, 106894. DOI: 10.1016/j.bpc.2022.106894
35. Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Filippova, T.A., Tumilovich, A.M., Strushkevich, N.V., Gilep, A.A., Khudoklinova, Y.Y., Shumyantseva, V.V. (2024) Bielelectrode strategy for determination of CYP2E1 catalytic activity: Electrodes with bacterosomes and voltammetric determination of 6-hydroxychlorzoxazone. *Biomedicines*, **12**(1), 152. DOI: 10.3390/biomedicines12010152
36. 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. *Electrochim. Acta*, **333**, 135539. DOI: 10.1016/j.electacta.2019.135539
37. Tracy, T.S. (2006) Atypical cytochrome P450 kinetics: Implications for drug discovery. *Drugs in R&D*, **7**, 349–363. DOI: 10.2165/00126839-200607060-00004
38. Alim, S., Vejjayan, J., Yusoff, M.M., Kafi, A.K.M. (2018) Recent uses of carbon nanotubes & gold nanoparticles in electrochemistry with application in biosensing: A review. *Biosens. Bioelectron.*, **121**, 125–136. DOI: 10.1016/j.bios.2018.08.051
39. Shumyantseva, V.V., Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Filippova, 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
40. 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
41. 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. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **506**, 215–219. DOI: 10.1134/S1607672922050131
42. 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
43. Koroleva, P.I., Gilep, A.A., Kraevsky, 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**(4), 457. DOI: 10.3390/bios13040457
44. Nerimetla, 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. *Electrochim. Acta*, **280**, 101–107. DOI: 10.1016/j.electacta.2018.05.085
45. Walker, A., Walgama, C., Nerimetla, R., Alavi, S.H., Echeverria, E., Harimkar, S.P., McIlroy, D.N., Krishnan, S. (2020) Roughened graphite biointerfaced with P450 liver microsomes: Surface and electrochemical characterizations. *Colloids Surf., B*, **189**, 110790. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.110790
46. Vimal, A., Kumar, A. (2017) Biotechnological production and practical application of L-asparaginase enzyme. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **33**(1), 40–61. DOI: 10.1080/02648725.2017.1357294
47. Pokrovskaya, M.V., Pokrovsky, V.S., Aleksandrova, S.S., Sokolov, N.N., Zhdanov, D.D. (2022) Molecular analysis of L-asparaginases for clarification of the mechanism of action and optimization of pharmacological functions. *Pharmaceutics*, **14**, 599. DOI: 10.3390/pharmaceutics14030599
48. Darvishi, F., Jahanafrooz, Z., Mokhtarzadeh, A. (2022) Microbial L-asparaginase as a promising enzyme for treatment of various 516 cancers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **106**, 5335–5347. DOI: 10.1007/S00253-022-12086-8/TABLES/3
49. Shumyantseva, V., Bulko, T., Pronina, V., Kanashenko, S., Pokrovskaya, M., Aleksandrova, S., Zhdanov, D. (2022) Electroenzymatic model system for the determination of catalytic activity of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *Processes*, **10**(7), 1313. DOI: 10.3390/pr10071313
50. Ćwilichowska, N., Świdarska, K.W., Dobrzyń, A., Drąg, M., Poręba, M. (2022) Diagnostic and therapeutic potential of protease inhibition. *Mol. Aspects Med.*, **88**, 101144. DOI: 10.1016/j.mam.2022.101144
51. Hua, Y., Nair, S. (2015) Proteases in cardiometabolic diseases: Pathophysiology, molecular mechanisms and clinical applications. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1852**(2), 195–208. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.04.032
52. Craik, C.S., Page, M.J., Madison, E.L. (2011) Proteases as therapeutics. *Biochem. J.*, **435**(1), 1–16. DOI: 10.1042/BJ20100965
53. Hotinger, J.A., Gallagher, A.H., May, A.E. (2022) Phage-related ribosomal proteases (Prps): Discovery, bioinformatics, and structural analysis. *Antibiotics*, **11**(8), 1109. DOI: 10.3390/antibiotics11081109
54. Anirudhan, V., Lee, H., Cheng, H., Cooper, L., Rong, L. (2021) Targeting SARS-CoV-2 viral proteases as a therapeutic strategy to treat COVID-19. *J. Med. Virol.*, **93**(5), 2722–2734. DOI: 10.1002/jmv.26814
55. Filippova, T.A., Masamrekh, R.A., Khudoklinova, Y.Y., Shumyantseva, V.V., Kuzikov, A.V. (2024) The multifaceted role of proteases and modern analytical methods for investigation of their catalytic activity. *Biochimie*, **222**, 169–194. DOI: 10.1016/j.biochi.2024.03.006
56. Fabry, P., Moutet, J.C. (2013) Sensitivity and Selectivity of Electrochemical Sensors. In: *Chemical and Biological Microsensors: Applications in Liquid Media* (Fouletier, J., Fabry, P., eds.), ISTE Ltd, London – John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, pp. 45–80. DOI: 10.1002/9781118603871.ch3
57. Ostojić, J., Herenda, S., Bešić, Z., Miloš, M., Galić, B. (2017) Advantages of an electrochemical method compared to the spectrophotometric kinetic study of peroxidase inhibition by boroxine derivative. *Molecules*, **22**(7), 1120. DOI: 10.3390/molecules22071120
58. Rodriguez-Rios, M., Megia-Fernandez, A., Norman, D.J., Bradley, M. (2022) Peptide probes for proteases — innovations and applications for monitoring proteolytic activity. *Chem. Soc. Rev.*, **51**(6), 2081–2120. DOI: 10.1039/d1cs00798j
59. González-Fernández, E., Avlonitis, N., Murray, A.F., Mount, A.R., Bradley, M. (2016) Methylene blue not ferrocene: Optimal reporters for electrochemical detection of protease activity. *Biosens. Bioelectron.*, **84**, 82–88. DOI: 10.1016/j.bios.2015.11.088
60. Zambry, N.S., Obande, G.A., Khalid, M.F., Bustami, Y., Hamzah, H.H., Awang, M.S., Aziah, I., Manaf, A.A. (2022) Utilizing electrochemical-based sensing approaches for the detection of SARS-CoV-2 in clinical samples: A review. *Biosensors*, **12**(7), 473. DOI: 10.3390/bios12070473

61. Filippova, T.A., Masamrekh, R.A., Shumyantseva, V.V., Latsis, I.A., Farafonova, T.E., Ilina, I.Y., Kanashenko, S.L., Moshkovskii, S.A., Kuzikov, A.V. (2023) Electrochemical biosensor for trypsin activity assay based on cleavage of immobilized tyrosine-containing peptide. *Talanta*, **257**, 124341. DOI: 10.1016/j.talanta.2023.124341
62. Anne, A., Chovin, A., Demaille, C. (2012) Optimizing electrode-attached redox-peptide systems for kinetic characterization of protease action on immobilized substrates. Observation of dissimilar behavior of trypsin and thrombin enzymes. *Langmuir*, **28**(23), 8804–8813. DOI: 10.1021/la301316r
63. Ucar, A., González-Fernández, E., Staderini, M., Avlonitis, N., Murray, A.F., Bradley, M., Mount, A.R. (2020) Miniaturisation of a peptide-based electrochemical protease activity sensor using platinum microelectrodes. *Analyst*, **145**(3), 975–982. DOI: 10.1039/c9an02321f
64. Li, R., Chen, X., Zhou, C., Dai, Q.Q., Yang, L. (2022) Recent advances in  $\beta$ -lactamase inhibitor chemotypes and inhibition modes. *Eur. J. Med. Chem.*, **242**, 114677. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114677
65. di Felice, F., Micheli, G., Camilloni, G. (2019) Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview. *J. Biosci.*, **44**(2), 38. DOI: 10.1007/s12038-019-9856-8
66. Gonzalez, J.G., Hernandez, F.J. (2022) Nuclease activity: An exploitable biomarker in bacterial infections. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **22**(3), 265–294. DOI: 10.1080/14737159.2022.2049249
67. Ding, J., Qin, W. (2013) Potentiometric sensing of nuclease activities and oxidative damage of single-stranded DNA using a polycation-sensitive membrane electrode. *Biosens. Bioelectron.*, **47**, 559–565. DOI: 10.1016/j.bios.2013.03.066
68. Agafonova, L.E., Zhdanov, D.D., Gladilina, Y.A., Shishparenok, A.N., Shumyantseva, V.V. (2024) Electrochemical approach for the analysis of DNA degradation in native DNA and apoptotic cells. *Heliyon*, **10**(3), e25602. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e25602

Поступила: 24. 04. 2024.  
После доработки 04. 06. 2024.  
Принята к публикации: 01. 07. 2024.

## NEW HIGHLY SENSITIVE METHODS FOR ELECTROANALYSIS OF THE CATALYTIC ACTIVITY OF ENZYMES OF MEDICAL SIGNIFICANCE

V.V. Shumyantseva<sup>1\*</sup>, L.E. Agafonova<sup>1</sup>, T.V. Bulko<sup>1</sup>, P.I. Koroleva<sup>1</sup>, A.V. Kuzikov<sup>2</sup>, R.A. Masamrekh<sup>2</sup>, T.A. Filippova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: viktorina.shumyantseva@ibmc.msk.ru  
<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Pirogov Russian National Research Medical University,  
1 Ostrovitianova str., Moscow, 117997 Russia

The review is devoted to new highly effective methods for analyzing the catalytic activity of enzymes of medical significance, such as cytochromes P450, trypsin, asparaginase, beta-lactamase, and nucleases. The methods are based on registration the specific activity of enzymes using electroanalytical methods. The review analyzes the experimental data obtained by the authors. Two platforms have been developed that allow quantitative measurement of catalytic activity based on the electrochemical properties of the enzyme (cytochrome P450, bactosomes, asparaginase) or substrate (trypsin, nucleases, restriction enzymes, beta-lactamase).

**Key words:** cytochrome P450; substrates; inhibitors; asparaginase; enzymatic catalysis; electrochemical analysis

### 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) (No. 122030100168-2).

Received: 24.04.2024; revised: 04.06.2024; accepted: 01.07.2024.