Биомедицинская химия, 2004, том 50, вып. 3, с.243-259

УДК 612.015.1:577.152.162.08

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЦИТОХРОМОВ Р450 - ПУТЬ К СОЗДАНИЮ БИОСЕНСОРОВ И БИОРЕАКТОРОВ.

В.В. Шумянцева, Т.В. Булко, А.И. Арчаков

Государственное учреждение научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН
119121 Москва Погодинская ул., д. 10; тел.: 7 (095) 246-58-20,
факс: 7(095) 245-08-57, эл.почта: victoria@ibmh.msk.su

Обобщены литературные данные по электрохимическому восстановлению гемопротеина цитохрома Р450. Обсуждены преимущества и недостатки каждого из трех поколений ферментных биосенсоров. В обзоре затронуты проблемы создания ферментных электродов - трансдьюсеров - на основе цитохрома Р450 как основного элемента при конструировании электрохимических биосенсоров. Обсуждены также различные типы электродов, используемые в биоэлектрохимии, и новые подходы для иммобилизации цитохромов Р450 на электродах. Применение нанотехнологий при электрохимическом восстановлении цитохрома Р450 в недалеком будущем позволит использовать эти подходы для производства биосенсоров и биореакторов медицинского назначения.

Ключевые слова: цитохром Р450, биоэлектрохимия, биосенсоры, нанотехнология, ферментные электроды, электронный транспорт.

ВВЕДЕНИЕ. Цитохромы Р450 представляют собой большую надсемью гемтиолатных монооксигеназ. Цитохромы Р450 играют важную роль в окислении неполярных низкомолекулярных химических соединений, как попадающих в организм извне (лекарственные вещества, яды, пищевые добавки, атмосферные загрязнения и др.), так и образующихся в клетке (холестерин, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, стероидные гормоны, простагландины и др.) [1-3]. Продукты окисления этих субстратов, число которых достигает десятков тысяч, в дальнейшем или используются в качестве регуляторов в системах метаболизма клеток, или выводятся из организма. Цитохромы Р450 являются монооксигеназами, уникальное свойство которых заключается в способности гидроксилировать неактивированные атомы углерода [4, 5]. Цитохромы метаболизируют около 1 млн различных соединений, катализируя примерно 60 типов химических реакций: гидроксилирование, N-, O- или S-деметилирование, деалкилирование, эпоксидирование и т. д. [1]. Эта особенность цитохромов Р450 делает их перспективными в использовании для анализа содержания в различных средах лекарственных препаратов и других ксенобиотиков и их метаболитов, а также для стереонаправленного синтеза стероидов и других биологически активных соединений. Повышение эффективности ферментативного катализа гемопротеинов является важной практической задачей.

Электронный транспорт в биологических системах осуществляется, как правило, в присутствии молекул-доноров электронов, например, NADPH, NADH, и молекул-медиаторов переноса электронов, например, флавиновых редуктаз, негемовых железо-серных белков и т.д. В процессе восстановления происходит истощение NADPH или NADH. Одним из возможных альтернативных методов восстановления цитохромов Р450 является электрохимическое восстановление, при котором источником электронов является электрод. Актуальность такого подхода связана с перспективой использования цитохромов Р450 и ферментных электродов на их основе в качестве тест-систем - биосенсоров, а также биореакторов для синтеза физиологически активных соединений.

Принципы биоэлектрокатализа как нового направления были изложены в работах ряда авторов [6-21]. Использование электрохимических систем для окислительно-восстановительных (редокс) ферментов, и в особенности, металлоферментов, является в настоящее время бурно развивающейся областью [22-25].

Существуют два основных подхода для эффективного переноса электронов между белком и электродом:

1. Непрямой транспорт в присутствии медиаторов. В этом случае низкомолекулярные редокс-соединения - медиаторы - используются для переноса электронов между белком и электродом.

2. Прямой безмедиаторный транспорт. В этом случае осуществляется непосредственный перенос электронов между белком (ферментом) и электродом.

Во многих случаях для повышения эффективности электронного транспорта между электродом и макромолекулами используют низкомолекулярные редокс-неактивные соединения, называемые промоторами, которые присутствуют или в растворе, или адсорбированы на поверхности электрода.

По мнению многих авторов прямой безмедиаторный электронный транспорт наиболее перспективен [20, 26, 27]. Однако на этом пути имеются многочисленные трудности [28]:

1. Редокс-участок белка обычно погружен в белковую глобулу. Поэтому электронный транспорт зависит от ориентации белка на электроде, даже если белок контактирует с электродом.

2. Вероятность такой "продуктивной" ориентации очень мала.

3. На металлических электродах белки имеют тенденцию к быстрой и необратимой адсорбции, связанной с конформационными изменениями и потерей активности. При этом на электроде образуется слой белкового "изолятора", который препятствует обмену электронов между электродом и раствором.

Несмотря на перечисленные трудности, биоэлектрохимия редокс-белков бурно развивается последние 20 лет.

Целью настоящего обзора является анализ литературных данных по электрохимическому восстановлению цитохромов Р450 и подходов к созданию биосенсоров на их основе.

1. Типы электродов, используемых в биоэлектрохимических исследованиях

В электрохимических исследованиях гемопротеинов использовались различные типы электродов. В ранних работах описано использование ртутных капельных электродов (dropping Hg electrodes) и методов классической полярографии [29, 30]. Но белки быстро и необратимо адсорбируются на ртути и электрохимический ответ трудно интерпретировать вследствие сигналов от адсорбции, которые искажают окислительно-восстановительные процессы. Цитохром Р450 2В4 не восстанавливался на ртутном и никелевом электродах, а при потенциале -1,5 В (относительно каломельного электрода, SCE) гемопротеин инактивировался, и восстановлению подвергалась его инактивированная форма Р420 [29, 31].

Пирографит для электродов образуется при осаждении углерода из газовой фазы и имеет кристаллическую структуру, весьма близкую к идеальному кристаллу графита [32]. Вследствие своей строго упорядоченной структуры, пирографит анизотропен и образует два сильно различающихся типа поверхностей: параллельную поверхность (basal plane) с насыщенными валентностями углерода, и угловую поверхность (edge face PEG), на которой могут образоваться С-О группы за счет различных обработок или просто при полировке на воздухе. Вследствие наличия С-О групп поверхность PEG пирографита была эффективно использована для исследования электрохимии гемопротеинов, таких как цитохром *c*, цитохром P450cam [33, 34].

Так как на металлических электродах (например, золотых, платиновых, никелевых, серебряных) белки и ферменты имеют тенденцию к быстрой и необратимой абсорбции, связанной с конформационными изменениями и потерей активности, необходимо использование промоторных молекул. Промоторы обычно представляют собой ди- или полифункционные молекулы типа X~Y, где X - заместитель, который связывается с металлической поверхностью (пиридил, фосфин, сульфгидрил, тиоэфир), Y (-COOH, NH_2, пиридил), реагирует с функциональными группами на поверхности белков. Расстояние между ними должно быть таким, чтобы не препятствовать связыванию X с поверхностью электрода. С поверхностью золотых или никелевых электродов обычно связываются такие соединения как, например, 4,4' - дипиридил, 4,4' - дитиодипиридин, алкантиолы [35-38]. Промоторные свойства 4,4' - дипиридила были исследованы при восстановлении цитохрома P450cam и микросомального цитохрома P450 2B4 на никелевом электроде при потенциале -1,1 В (относительно каломельного электрода, SCE) [35]. Однако электрохимическое восстановление цитохромов P450 осложняется тем, что 4,4'-дипиридил восстанавливается при потенциале -0,8 В, а так же тем, что 4,4'-дипиридил образует комплекс с окисленной формой этого гемопротеина. Авторы не исследовали монооксигеназную активность цитохрома P450cam и микросомального цитохрома P450 2B4 в условиях аэробного электролиза.

Используются графитовые электроды [32] и электроды, изготовленные из углеродных нанотрубок [39], золотые и платиновые электроды, а также электроды, изготовленные из полупроводниковых материалов (оксид индия, оксид олова), и химически модифицированные графитовые материалы [24]. Для исследования прямого электронного транспорта использовали электроды из стеклографита (glassy carbon electrodes) [40], оксидов металлов, например, оксида индия In_2O_3, [41].

Поверхность графита (carbon paste) или оксида индия In_2O_3 отрицательно заряжена и может связывать неорганические катионы (Mg^{2+}) или (небольшие) органические полиамины (например, неомицин). Кроме того, описано использование модифицированных графитовых электродов с добавлением катализаторов окислительно-восстановительных процессов (например, родия, как катализатора восстановления кислорода до пероксида водорода или воды, или металлокомплексов, как эффективных медиаторов электронного транспорта) [42-44].

При конструировании биосенсоров широко используются электроды, полученные методом трафаретной печати. Такие электроды имеют ряд преимуществ: низкий базовый (калибровочный) ток, миниатюрность, возможность химической модификации электродов [45].

Ферментативная активность цитохромов P450 может быть зарегистрирована при помощи конвекционного кислородного электрода Кларка [25]. Этот метод основан на поглощении кислорода в процессе монооксигеназной каталитической реакции. Электрод Кларка использовался в биохимических исследованиях P450, а также для конструирования биосенсоров [46-48]. Чувствительность электрода Кларка лежит в диапазоне 10-100 мкМ [46]. Однако, вследствие несопряженных каталитических реакций цитохрома P450 с субстратами, генерацией активных форм кислорода в отсутствие субстратов, а также сложной стехиометрией каталитического цикла цитохрома P450 [49], этот метод имеет ряд ограничений и не может быть использован для количественной оценки активности этого гемопротеина.

2. Электрохимическое восстановление цитохром Р450-содержащих систем в растворе

Перенос электронов в основной микросомальной ферментативной системе, содержащей цитохромы Р450, происходит согласно следующей схеме [1-3]:

NADPH→NADPH-зависимая цитохром Р450 редуктаза (FAD, FMN)→ цитохром Р450

Донором электронов является NADPH, транспортным белком для переноса электронов от NADPH к гемопротеину цитохрому Р450 являтся микросомальный флавопротеин NADPH-P450-редуктаза. В митохондриальной или бактериальной системе в качестве белков-партнеров участвуют адренодоксинредуктаза - адренодоксин или путидоредоксин редуктаза - путидоредоксин соответственно.

Для преодоления сложностей, связанных с многокомпонентностью таких систем, методами генетической инженерии были получены слитные белки (fusion proteins) цитохромов Р450 и редуктазы [50]. Использование вместо NADPH катодного электрического тока для восстановления компонентов "химерных" белков в оксигеназных реакциях позволило получить электрохимические системы с эффективностью, близкой к природным [42, 51-53]. Например, N-деметилирование бензфетамина в системе, состоящей из слитного белка цитохрома Р450 3А4 и редуктазы, в NADPH-зависимой реакции и при электролизе протекает со скоростями 4,6 и 2,0 нмоль/мин/нмоль Р450 соответственно [50].

Авторы использовали в качестве рабочего электрода золотой или платиновый электроды и систему, состоящую из очищенного рекомбинантного белка, содержащего Р450 4А1 и NADPH-зависимую цитохром Р450 редуктазу [42, 52, 53]. Кроме рекомбинантного белка электрохимическая система содержала в качестве медиатора координационное соединение кобальта (III) - (S)-1,3,6,8,10,13,16,19 - октаазабицикло-[6.6.6]ейкозан)кобальт(Ш). Стандартный окислительно-восстановительный потенциал этого соединения Е = -350мВ (относительно нормального водородного электрода, NHE). Авторы предполагают, что на катоде в первую очередь происходит восстановление иона кобальта (III) Co^{3+} по схеме $Co^{3+} + 1e \rightarrow Co^{2+}$ в составе координационного соединения. Так как при проведении электролиза в системе, содержащей только флавопротеинредуктазу или гемопротеин - цитохром Р450, не происходит гидроксилирования субстрата - лауриновой кислоты, можно сделать вывод, что ион кобальта Co^{2+} восстанавливает флавиновые нуклеотиды в составе редуктазы, которые, в свою очередь, восстанавливают железо гема цитохрома Р450. Активация кислорода происходит на восстановленном железе гема в тройном комплексе субстрат-Fe^{2+}-O_2, обеспечивая возможность окисления различных субстратов в физиологических условиях с высокими скоростями [1, 3]. При электрохимическом восстановлении рекомбинантного белка генерируется пероксид водорода, разрушающий ферментативную систему. Добавление каталазы повышает эффективность системы при гидроксилировании субстрата. Авторы показали, что наибольшая скорость гидроксилирования лауриновой кислоты наблюдается при напряжении Е = -450мВ (относительно NHE).

Была исследована реконструкция холестерингидроксилирующей системы из митохондрий коры надпочечников на основе цитохрома Р450scc (CYP11A1), адренодоксина и редокс-медиатора нейтрального красного (3-амино-7-диметиламино-2-метилфеназин) [54]. Электрохимическое восстановление компонентов этой сложной системы исследовалось с помощью метода цикловольтамперометрии. При насыщающей концентрации медиатора, постоянном потенциале катода Е = -0,59В (относительно насыщенного каломельного электрода SCE) глубина анаэробного восстановления гемопротеина составляла 77% за 30 мин электролиза. Рабочим электродом служил серебряный и стеклоуглеродный электроды. Авторы отмечают инактивацию белковых компонентов на серебряном катоде. При добавлении в аэробных условиях экзогенного холестерина происходило образование прегненолона, который накапливался пропорционально времени аэробного электролиза. Супероксиддисмутаза и каталаза не влияли на скорость образования прегненолона, что позволяет исключить неспецифическое окисление холестерина с участием супероксиданион-радикала и пероксида водорода. Каталитическая активность P450scc ограничена скоростью катодного восстановления нейтрального красного.

Другой подход для преодоления многокомпонентности цитохром P450-содержащих систем - создание полусинтетических флавогемопротеинов [55]. При химической модификации цитохрома P450 флавиновыми нуклеотидами или рибофлавином были получены однокомпонентные самодостаточные каталитически активные флавогемопротеины на основе цитохрома P450 2B4 и 1A2, обладающие NAD(P)H-зависимой редуктазной и монооксигеназной активностями. Было исследовано электрохимическое восстановление флавоцитохромов P450 2B4 и 1A2 в растворе [56, 57].

Так как простетическая группа гемопротеина цитохрома P450 погружена в белковую глобулу, прямое электрохимическое восстановление этих гемопротеинов затруднено.

С электрохимической точки зрения, цель химической модификации определенных участков больших молекул - превращение их из электрических изоляторов в проводники. Редокс-ферменты, как правило, имеют молекулярную массу от 12000 (цитохром *c*) до 850000 (холиндегидрогеназа) с одним или более редокс-центрами. Их средний гидродинамический диаметр от 5 до 150 Å. В большинстве ферментов редокс-центры локализованы достаточно далеко от наружной поверхности, что делает эти центры труднодоступными. Следовательно, большинство ферментов не обменивается электронами с электродом, на котором они адсорбированы, то есть их редокс-центры ни электроокисляются при положительных потенциалах, ни электровосстанавливаются при отрицательных. Химическая модификация белковой оболочки может изменить изоляционные свойства на токопроводящие. Вследствие таких изменений редокс-центры ферментов будут переносить электроны к электроду (от электрода) на котором адсорбирован фермент. Зависимость скорости электронного транспорта от расстояния является объектом как экспериментальных, так и теоретических исследований. Скорость переноса электронов уменьшается экспоненциально в зависимости от расстояния между партнерами, когда расстояние превышает атомные размеры (> 3 Å) [58].

Химическая модификация белковой глобулы с помощью веществ, облегчающих перенос электронов, таких, например, как рибофлавин, превращает белки из изоляторов в проводники [59].

Электрохимическое восстановление флавоцитохромов RfP450 2B4 и RfP450 1A2 проводили с использованием в качестве рабочих родий-графитовых электродов, полученных методом трафаретной печати [45, 60, 61].

После 10 минут электролиза при потенциале E = - 500 мВ (относительно хлорсеребряного электрода) флавоцитохром RfP450 2B4 восстанавливается на 60% по сравнению с восстановлением с помощью дитионита натрия. Эти данные рассчитывались с помощью образования карбоксикомплекса восстановленной формы с монооксидом углерода. Немодифицированный цитохром P450 2B4 в этих условиях восстанавливается всего лишь на 5%. Ковалентно связанный рибофлавин служит веществом, понижающим потенциальный барьер при туннелировании электрона "электронным туннелирующим переносчиком" [59], облегчая перенос электронов к железу гема.

Для осуществления каталитического цикла цитохрома P450cam (CYP101) был использован подход, основанный на электрохимическом восстановлении путидаредоксина - редокс-партнера гемопротеина [62] в условиях анаэробиоза. Рабочим электродом служил оксид олова, допированный сурьмой. Во время электролиза потенциал рабочего электрода был -0,7 В относительно Ag/AgCl.

Кислород, необходимый для каталитической реакции, получали при электролизе воды на платиновом вспомогательном электроде. Биореактор работал 5 часов с образованием 36 нмоль 5-*экзо*-гидроксикамфоры/нмоль P450cam/мин.

Прямое безмедиаторное электрохимическое восстановление в растворе было исследовано только для бактериального водорастворимого цитохрома P450cam (CYP101), а также его четырех мутантных форм. В качестве рабочих использовали пирографитовый или золотой электроды в 12-15 мкМ растворе гемопротеинов [34, 63-65]. Электролит содержал 1 мМ камфоры для стабилизации фермента. Авторы не исследовали каталитическую активность P450cam относительно камфоры.

Формальный окислительно-восстановительный потенциал $E_{0,5}$ рассчитывался как полусумма анодного и катодного потенциалов [9]: $E_{0,5} = 1/2\ (E_{p\,a} + E_{p\,c})$. Окислительно-восстановительный потенциал P450cam $E_{0,5}$ =-447 мВ (относительно насыщенного каломельного электрода, s. SCE), а $E_{0,5}$ мутантных форм лежит в диапазоне от -428 до -449 мВ.

Скорости гетерогенного переноса электронов, рассчитанные по электрохимическим параметрам, существенно ниже, чем скорости в биологических системах, содержащих белки-редокс партнеры, и составляют менее чем 0,01 $с^{-1}$. Необходимо отметить, что в литературе не описано прямое безмедиаторное электрохимическое восстановление других изоформ цитохромов P450 в растворе.

3. Получение ферментных электродов (биосенсоров) на основе цитохрома Р450. Биоэлектрокатализ с помощью химически модифицированных электродов

Впервые использование ферментов для связывания их с электродами было описано в работе Clark и Lyons в 1962 году. Эта работа считается пионерской в конструировании биосенсоров [66], так как ферментные электроды являются основным элементом таких устройств. Прогресс в этой области связан с развитием методов иммобилизации ферментов на электродах с целью повышения эффективности электронного транспорта и стабильности электродов [67, 68]. Иммобилизация ферментов на электродах облегчает разделение продуктов ферментативной реакции и биокатализатора и делает более эффективным перенос электронов между редокс-группами белка и электродом. Описано включение ферментов, в частности, оксигеназ, в полипиррольные матрицы, полианилиновые, полиацетиленовые, политиофеновые, полииндольные токопроводящие полимеры [69-72] или в органические гидрогели [73, 74]. Иммобилизация коферментов, антител, клеток и биологических тканей также иллюстрирует широкие возможности метода для конструирования биосенсоров [75, 76]. На практике возникает необходимость создания высокочувствительных, быстрых и инструментально несложных устройств, предназначенных для выполнения различных анализов, например, объектов окружающей среды, для контроля качества технологических производств, контроля качества продуктов и в ряде других областей [25, 77].

3.1. Включение цитохрома P450cam в токопроводящий слой полипиррола.

Иммобилизация цитохром P450cam была проведена при электрополимеризации пиррола на электродах оксида олова, допированных индием (ITO) [48]. В присутствии камфоры была исследована каталитическая активность системы. Методами газовой хроматографии и масс-спектрометрии было показано образование продукта электрокатализа - гидроксикамфоры. С помощью электрода Кларка было исследовано поглощение кислорода. Максимальное поглощение наблюдалось в диапазоне потенциалов 0-0,4 В (относительно SCE), хотя окислительно-восстановительный потенциал P450cam $E_{0,5}$ находится в более отрицательной области значений. Поглощение кислорода возрастало в присутствии камфоры от 0,2 ппм/мг/час до 1,5 ппм/мг/час. Эта работа демонстрирует подход к созданию биореактора с использованием электрокатализа P450cam по отношению к природному субстрату - камфоре.

3.2. Восстановление цитохрома P450cam (CYP101) в пленках мембраноподобных поверхностно-активных веществ.

Дизайн поверхности электродов является существенным фактором для прямого переноса электронов в гетерофазной реакции между твердым электродом и белком на поверхности электрода. При использовании пленок димиристоил-L-α-фосфатидилхолина (DMPC) и дидодецилдиметиламмоний бромида (DDAB), которые служат мембраноподобной матрицей для цитохрома P450cam, происходит прямое обратимое восстановление гема $Fe^{3+} + 1e^{-} \rightarrow Fe^{2+}$ [78]. DMPC и DDAB образуют стабильные жидко-кристаллические пленки при 25°C [79]. Рабочим электродом служил пирографитовый дисковый электрод. Природа фосфолипида оказывает влияние на окислительно-восстановительный потенциал P450cam. Так, в пленках DMPC $E_{0,5}$ =-113 мВ (относительно NHE), а в пленках DDAB $E_{0,5}$ = 6 мВ. При включении гемопротеина в пленки мембраноподобных веществ происходит смещение потенциала в более положительную область значений. В растворе высокоочищенный P450cam имеет $E_{0,5}$=-272 мВ (относительно NHE) [34]. В аэробных условиях наблюдается электрохимическое восстановление кислорода, регистрируемое по возрастанию каталитического тока цикловольтамперограмм. Электрокатализ был исследован при восстановлении трихлоруксусной кислоты (ТСА). Это соединение не является природным субстратом P450cam. В присутствии кислорода и 50 мМ ТСА наблюдается существенное возрастание каталитического восстановительного тока и уменьшение окислительного тока. Несмотря на отсутствие анализа продуктов электрокаталитической реакции, на основе появления каталитического тока авторы приводят доказательства ферментативного катализа этой реакции.

Ферментные электроды с жидкокристаллическими пленками мембраноподобных веществ и P450cam демонстрировали четкие цикловольтамперограммы, но были нестабильны в гидродинамических условиях амперометрических экспериментов. В связи с этим был разработан метод ковалентной иммобилизации P450cam в присутствии глутарового альдегида [80]. Стеклоуглеродный и платиновый электроды с иммобилизованным P450cam, включенным в везикулярную систему DDAB и этилендиамина, были использованы в качестве рабочих при разработке амперометрических биосенсоров. Окислительно-восстановительный потенциал P450cam $E_{0,5}$ =-260 мВ (относительно SCE). Электролитом служил 0,05 М фосфатный буфер, содержащий координационное соединение кобальта (III) - 25мкМ (S)-1,3,6,8,10,13,16,19 - октаазабицикло-[6.6.6]ейкозан)кобальт(Ш) в качестве медиатора переноса электронов. Амперометрические эксперименты проводились при напряжении E = -800 мВ (относительно Ag/AgCl). В качестве субстратов исследовались камфора, фенхон и адамантан. По амперометрическим данным были рассчитаны такие кинетические параметры как максимальный каталитический ток I_{max} и кажущиеся константы Михаэлиса $K_м'$ для P450cam-биоэлектродов. $K_м'$ для исследуемых соединений 1,41 - 3,9 мМ, предел определяемых концентраций 2,0 мМ.

Электрохимическое восстановление бактериального цитохрома P450cin (CYP176A), гидроксилирующего цинеол, также исследовалось в пленках поверхностно-активных веществ [81]. В присутствии природного субстрата - цинеола - не происходит анодное (в положительную область) смещение окислительно-восстановительного потенциала гемопротеина.

Полусинтетические флавоцитохромы, полученные на основе микросомальных цитохромов P450 2B4, P450 1A2 и митохондриального P450scc, были исследованы в электрохимических реакциях при иммобилизации на печатных родий-графитовых электродах [82]. Иммобилизация проводилась в присутствии глутарового альдегида и синтетических фосфолипидов, содержащих устойчивые к окислению α-разветвленные ацильные цепи [83]. При проведении электролиза при контролируемом напряжении (E = -500 мВ относительно хлорсеребряного электрода) были проанализированы продукты электрокаталитических реакций и рассчитаны соответствующие константы скоростей k_{cat}. Например, константы скорости реакции О-деалкилирования 7-пентоксирезоруфина в условиях электролиза с использованием ферментного электрода флавоцитохром RfP450 2B4, k_{cat}=0,11 ± 0,04 мин$^{-1}$. Микросомы катализируют аналогичную реакцию с k_{cat}=0,7-1,0 мин$^{-1}$. Ферментные RfP450 2B4-электроды были использованы для исследования субстратов и ингибиторов цитохрома Р450 2B4. Метирапон является ингибитором цитохрома Р450 2B4. В присутствии метирапона каталитический ток при амперометрических измерениях отсутствует. При добавлении аминопирина - типичного субстрата этой изоформы - также не регистрируются изменения тока. Камфора не является субстратом цитохрома Р450 2B4. Аминопирин в присутствии камфоры может быть зарегистрирован по изменению каталитического тока [84]. Ферментные электроды на основе цитохромов Р450 могут быть использованы для скрининга потенциальных субстратов и (или) ингибиторов этого гемопротеина.

При исследовании электрохимических параметров цитохрома P450scc в качестве диффузионного медиатора был использован рибофлавин [85]. Чувствительность амперометрического P450scc-биосенсора к холестерину (при использовании глутарового альдегида и мембраноподобных пленок дилауроилфосфотидилхолина) 13,8 нА·мкМ$^{-1}$, определяемый предел концентраций 300 мкМ. При включении цитохрома P450scc и рибофлавина как диффузионного медиатора в гидрогель агарозы чувствительность биосенсора возрастает: 6,9 -7 нА·мкМ$^{-1}$ и определяемый предел концентраций 155 - 160 мкМ. Возможно, глутаровый альдегид снижает каталитическую активность за счет частичной химической модификации гемопротеина. Печатные электроды с иммобилизованным P450scc являются прототипом амперометрических биосенсоров для количественного определения холестерина в биологических средах.

3.3. Создание полиионных пленок методом послойного нанесения.

Прямое безмедиаторное электрохимическое восстановление цитохрома P450cam описано в работах с использованием послойного нанесения на золотые электроды полианионов полистиролсульфонатов, ДНК, гемопротеина и полидиметилдиаллиламмоний хлорида [86-88]. Адсорбцию P450cam проводили при pH 5,2. Рост и толщина пленок при послойной адсорбции контролировалась с помощью кварцевых микровесов (QCM). Концентрация P450cam при таком способе составляет $0{,}18\times10^{-10}$ моль·см$^{-2}$ или 820 нг·см$^{-2}$. Электрохимические процессы таких ионных комплексов были исследованы методом цикловольтамперометрии. Наблюдалась линейная зависимость амплитуды пиков от скорости сканирования 0,01-1 В/с. Окислительно-восстановительный потенциал P450cam $E_{0,5}$ =-250 мВ относительно SCE (-6 мВ относительно NHE) при pH 7,0 в 0,1 М NaCl. P450cam в полиионных пленках катализировал окисление стирола до оксида стирола. Электролиз проводили при потенциале -600 мВ относительно SCE в течение 1 часа. Механизм этой реакции, по мнению авторов, заключается в электрохимическом восстановлении кислорода, катализируемом P450cam. Пероксид водорода образуется как при каталитическом, так и прямом электрохимическом восстановлении кислорода. Кроме оксида стирола образуется бензальдегид как результат реакции стирола с пероксидом водорода.

Метод послойного нанесения, с использованием золотых электродов был использован для конструирования амперометрического биосенсора на основе рекомбинантного человеческого CYP3A4 [89]. Субстратами этого гемопротеина являются верапамил, мидазолам, хинидин, прогестерон. На золотой дисковый электрод последовательно адсорбировали 3-меркапто-1-пропенсульфокислоту, CYP3A4 (19,4 мкМ), и полидиметилдиаллиламмоний хлорид. Окислительно-восстановительный потенциал CYP3A4 $E_{0,5}$ = 98±5 мВ (относительно NHE). Интегрированием восстановительного пика цикловольтамперограмм рассчитано количество электроактивных частиц на электроде с помощью формулы:

Q = mF (Q - количество электричества, C; m - количество электроактивных частиц, mol; F- число Фарадея, 96485 C/mol)

По данным авторов, 19,6 пмоль/см^2 электроактивного CYP3A4 присутствует на поверхности биосенсора, что составляет 70% адсорбированного фермента по данным, полученным с помощью электрохимических кварцевых пьезокристаллических микровесов (QCM). Каталитическая активность CYP3A4-биосенсора регистрировалась в присутствии кислорода и в присутствии субстратов этого гемопротеина. Амперометрический ответ пропорционален концентрации субстратов. Время отклика биосенсора составляет 15-25 сек. Максимальная измеряемая концентрация верапамила соответствует 2,85 мМ. Вследствие низкой растворимости верапамила в буферных растворах эта концентрация является максимальной для амперометрического определения этого лекарственного препарата. В результате электролиза при -500 мВ (относительно Ag/AgCl) в присутствии 500 мкМ верапамила образуется норверапамил и N-метил-4-(3,4-диметоксифенил)-4-циано-5-метилгексиламин (D-617). Кетоконазол ингибировал образование продуктов электрокаталитической реакции на 80 %, а каталаза - на 50 %. Образование пероксида водорода в электрохимических реакциях отмечается многими авторами. Уменьшить концентрацию пероксида, по-видимому, возможно только при электролизе при более положительных потенциалах. При этом снижается эффективность электрохимического восстановления цитохрома P450, так как окислительно-воссстановительный потенциал этого гемопротеина соответствует области от 200 до 400 мВ (vs. Ag/AgCl).

3.4. Иммобилизация в присутствии полисилоксанов.

Для повышения стабильности P450-биоэлектродов был разработан метод иммобилизации цитохрома P450cam (CYP101) в везикулярных жидкокристаллических дисперсиях синтетического липида DDAB и золь-гелях, образуемых при гидролизе метилтриэтоксисилана [74, 90].

Техника включения в золь-гель матрицы (SGM) биологических объектов (ферментов, кофакторов, бактериальных клеток) широко используется при конструировании различных типов биосенсоров [91-93]. Золь-гели образуются при кислотном или щелочном гидролизе мономеров силана с последующей полимеризацией и образованием силоксановых гелей [92]. Золь-гели на основе силоксанов могут иметь различный размер пор и образуют сетчатую структуру, сходную с биологическими мембранами. Если на стадии полимеризации мономер содержит дополнительные ("допирующие") молекулы, они будут включены в образующийся полисилоксан. Природа допирующих молекул позволит создать оптимальные условия для фермента. Размер пор обычно достаточен для диффузии субстратов и продуктов в гель и из геля. Однако больший размер белков-ферментов препятствует вытеканию их из полимерной сетки. Архитектура стеклоуглеродного электрода на основе P450cam достаточно сложна. Для получения ферментного электрода авторы использовали бычий сывороточных альбумин, глутаровый альдегид, P450cam, золь-гель метилтриэтоксисилана, а также синтетический липид DDAB [74, 90]. Модифицированные таким образом стеклоуглеродные электроды (GCE) позволили зафиксировать быстрый обратимый перенос электронов между электродом и гемом P450cam в анаэробных условиях не только в водной, но и в органической фазе (ацетонитрил - вода 9:1). Важно отметить, что окислительно-восстановительный потенциал P450cam в водном буферном растворе $E_{0,5}$ = -356 мВ, а в 90% ацетонитриле $E_{0,5}$= -300 мВ, что свидетельствует о влиянии микроокружения фермента на электрохимические реакции. Электрохимический катализ биосенсора GCE/P450cam/DDAB/SG был исследован в присутствии 3 мМ камфоры или 3 мМ пирена при различной температуре. Эффективность биосенсора, измеряемая по отношению диффузионно контролируемого тока (без субстрата) I_D к кинетически контролируемому (каталитическому в присутствии субстрата) I_K не изменяется при температуре от 20° С до 30° С, экспоненциально возрастает и достигает максимума при температуре 45° С, а затем уменьшается. Энергия активации E_a, рассчитанная по уравнению Аррениуса $I_K/I_D = Ae^{-E_a/RT}$, (где A - предэкспоненциальный фактор, R - газовая постоянная, Т - температура) равна 29,7 кДж/моль. GCE/P450cam/DDAB/SG - биосенсор был стабилен в течение 4 недель при 4° С.

Золь-гель матрицы на основе [3-(2,3-эпоксипропокси)-пропил]-триметоксисилана и 3-аминопропил-триэтоксисилана были использованы для получения ферментных электродов на основе флавоцитохромов и цитохромов Р450 2В4 и P450scc [84]. В качестве рабочих были использованы печатные графитовые электроды. Модифицированные полисилоксанами электроды демонстрировали четкие цикловольтамперограммы восстановления гемопротеинов и полусинтетических флавогемопротеинов, но были нестабильны в гидродинамических условиях амперометрических экспериментов вследствие недостаточной адгезии полисилоксанов к поверхности печатных электродов. Работа с печатными электродами в планарном режиме позволила преодолеть этот недостаток без дополнительной химической модификации ферментов.

Для улучшения метрологических характеристик амперометрических ферментных электродов предложено использование токопроводящих золь-гель матриц на основе пентаоксида ванадия [94].

3.5. Использование ион-селективных полевых транзисторов для конструирования биосенсоров на основе Р450 монооксигеназ.

Ион-селективные полевые транзисторы были использованы для иммобилизации химерного белка, содержащего CYP1A1 и NADPH-цитохром Р450 редуктазу из дрожжей [95]. Микросомы были иммобилизованы с помощью гидрогеля агарозы на мембране транзистора. Восстановление микросомальной системы проводили с помощью NADPH. При взаимодействии с субстратом - 7-этоксикумарином - происходит поглощение протона и защелачивние среды. При этом изменяется напряжение, регистрируемое коммерческим рН-метром. Каталитическая активность по отношению к 7-этоксикумарину регистрировалась также по изменению флуоресценции.

Было исследовано ингибирующее влияние дихлорфенолов и $MnCl_2$ на изменение напряжения, пропорциональное концентрации субстрата. Авторы считают, что увеличение напряжения отражает увеличение концентрации OH^- групп за счет ферментативной реакции. Чувствительность таких рН-биосенсоров сравнима с чувствительностью электрода Кларка [46]. В описанном методе не происходит электрохимическое восстановление цитохрома Р450, но метод детекции каталитической активности (т.е. наличия субстрата) основан на изменении электрохимического параметра - напряжения. Авторы считают такой метод перспективным вследствие простоты измерений и широкого спектра анализируемых соединений.

3.6. Использование наночастиц алюмосиликатов- глин - для получения химически модифицированных электродов.

В истинных растворах размеры частиц менее 1 нм. В водных растворах белки образуют коллоидные растворы с размерами частиц от 1 до 100 нм. Для повышения эффективности гетерогенного электронного транспорта между электродом и белком используются неорганические алюмосиликаты, образующие коллоидные растворы с размером частиц 1-100 нм. Электроды, модифицированные солями кремниевых кислот, впервые были описаны в 1983 году [96] и на протяжении последних 20 лет нашли широкое применение в аналитической электрохимии [97, 98]. Пленки диоксида кремния SiO_2 и миоглобина или цитохрома P450cam были исследованы в реакциях электрокаталитического эпоксидирования стирола [99]. Неорганические наночастицы обладают стабильной структурой, размерами, соизмеримыми с размерами белков, и поэтому эффективны для прямого переноса электронов между электродом и биокомпонентом [100, 101]. В работе [102] для модификации стеклоуглеродного электрода использовали монтмориллонит натрия (SMC) и раствор коллоидной платины (PSMC). При иммобилизации P450cam скорость гетерогенного переноса электронов в системе GCE/PSMC/P450cam сопоставима со скоростями биологических процессов. Константы скорости восстановления P450cam 5-152 c^{-1} при скоростях сканирования 0,4 - 12 В/с соответственно. Окислительно-восстановительный потенциал P450cam $E_{0,5}$= -356 мВ (относительно Ag/AgCl) и -139 мВ (относительно NHE). Значение потенциала адсорбированного P450cam смещено на 164 мВ в более положительную область по сравнению с данными в растворе. Смещение потенциала в положительную область обычно происходит при вытеснении воды из окружения гема. Анализ UV-VIS и FTIR спектров подтвердил сохранение вторичной структуры в присутствии коллоидных наночастиц монтмориллонита натрия. Возможно, процессы адсорбции приводят к частичной дегидратации гемопротеина. Прибавление камфоры незначительно сказывается на электрохимическом ответе системы стеклоуглеродный электрод/наночастицы монтмориллонита натрия/P450cam (GCE/PSMC/P450cam).

Электрохимическое восстановление микросомального цитохрома P450 2B4 с помощью стеклоуглеродных электродов, модифицированных монтмориллонитом натрия в присутствии коллоидной платины (PSMC), происходит с низкими скоростями. Восстановительный пик E_{red} = -430 мВ фиксируется только при скоростях сканирования, не превышающих 0,1 В/с (относительно Ag/AgCl) [103]. При прибавлении неионного детергента Tween-80 происходит дезагрегация олигомеров P450 2B4, и размеры гемопротеина, по-видимому, становятся соизмеримы с размерами электродной алюмосиликатной подложки. По данным атомной силовой микроскопии (AFM), мономеры P450 2B4 имеют средний диаметр и высоту 15-18 нм и 2,5-3 нм соответственно [104]. При включении мономерной формы P450 2B4 в пленки PSMC цикловольтамперограммы в анаэробных условиях демонстрировали обратимые окислительно-восстановительные процессы при скоростях сканирования от 0,5 до 10-12 В/с. Между электродом и белком происходит прямой обратимый перенос электронов. Окислительно-восстановительный потенциал P450 2B4 $E_{0,5}$ = -305 мВ (относительно Ag/AgCl). Линейная зависимость максимального значения токов от скорости сканирования свидетельствует о процессах, протекающих на поверхности электродов [9]. О каталитических свойствах этого типа электродов в присутствии кислорода и аминопирина свидетельствует каталитический ток, регистрируемый методом цикловольтамперометрии. Роль детергента заключается, по-видимому, не только в мономеризации олигомерной формы гемопротеина, но и в стабилизации наночастиц неорганической матрицы [105]

3.7. Использование наночастиц металлов для модификации электродов.

Наночастицы золота, серебра, палладия также используются в различных биоаналитических системах [106, 107]. Наночастицы металлов отличаются по физическим и химическим свойствам от металлов в твердом состоянии. В связи с этим наноматериалы интенсивно используются последние годы в области нанобиотехнологии, электрохимии, биоэлектрохимии [108]. Механизм обмена электронов между твердой и жидкой фазами является фундаментальной проблемой электрохимии. Наночастицы коллоидного золота исследовались в качестве межфазного проводника, улучшающего морфологию поверхности электродов [109]. Переход к нанометровой шкале, соизмеримой с размерами белков в растворе, позволяет более эффективно исследовать электрохимию редокс-белков. Наночастицы золота, стабилизированные синтетическим липидом DDAB, эффективно катализировали прямой перенос электронов между электродом и цитохромом *c* [110] или гемоглобином [111].

Прямое безмедиаторное восстановление цитохрома P450scc было исследовано с использованием печатных родий-графитовых электродов, модифицированных наночастицами золота [103]. Для стабилизации коллоидного раствора золота использовали додекантиол или тетраоктиламмонийбромид. Размер частиц, полученных по этому методу, лежит в диапазоне 1,5 -3 нм [112]. Ферментные электроды стабильны при работе в планарном режиме и не требуют дополнительных химических реагентов для иммобилизации гемопротеина.

3.8. Модификация золотых электродов с помощью цистамина и малеимида.

Рекомбинантный человеческий цитохром Р450 2Е1 был иммобилизован на золотом электроде за счет взаимодействия стерически доступных SH-групп цистеинов с поверхностью, модифицированной цистамином и малеимидом [113]. Авторами было проведено молекулярное моделирование третичной структуры этого гемопротеина для установления локализации потенциальных мест взаимодействия белка с поверхностью электрода. Окислительно-востановительный потенциал цитохрома Р450 2Е1, рассчитанный по данным цикловольамперометрии. соответствовал $E_{0,5}$ = -177±5 мВ. Скорость переноса электронов для этого типа электродов составляла 10 c^{-1}. Каталитическая активность измерялась по отношению к *п*-нитрофенолу - специфическому субстрату этой изоформы. С помощью электрохимических данных была рассчитана константа Михаэлиса: $K_м$ = 130 ± 3 мкМ. При проведении электролиза при контролируемом напряжении Е= -300 мВ концентрация продукта электрокаталитической реакции составляла 2,2 мкМ.

Работы по биоэлектрохимии рекомбинантных человеческих цитохромов (Р450 3А4, Р4502Е1) [89, 113] свидетельствуют о стремительном продвижении по пути создания панели биосенсоров для исследований в области фармакокинетики и индивидуальной химиотерапии.

4. Классификация биосенсоров.

Химический сенсор - это устройство, превращающее химическую информацию (концентрацию компонента) в удобный для детекции сигнал. Сенсор состоит из двух основных компонентов: системы химического (молекулярного) распознавания - рецептора и физико-химического преобразователя - трансдьюсера, соединенного со средствами измерения реакции (отклика) рецептора на изменение качественного состава среды. Биохимические сенсоры - это сенсоры, включающие биологический элемент (фермент, культуру клеток, антитела, ткань) и использующие реакции биомолекулярных или надмолекулярных структур [114, 115].

Трансдьюсер служит для преобразования и передачи информации на детектирующее устройство. По типу трансдьюсера сенсоры делят на оптические, электрические и гравиметрические. Во многих случаях использование электрических трансдьюсеров (электродов) предпочтительно, так как информация о биологическом распознавании преобразуется непосредственно в форму электрического сигнала.

Главное достоинство биохимических сенсоров - высокая избирательность и чувствительность в отношении специфических субстратов и биологически активных веществ.

Электрохимические биосенсоры, как правило, представляют собой электроды с иммобилизованным биологическим элементом. Сопряжение электродной и биохимической реакции является ключевой стадией в работе биосенсора.

Используются следующие аналитические характеристики биосенсоров:

1. Время отклика биосенсора зависит от нескольких параметров: скорости ферментативной реакции, скорости диффузии субстрата или продукта реакции к активному центру фермента.

Различают два режима работы такого электрода: кинетический и динамический. В кинетическом режиме скорость процесса определяется скоростью ферментативной реакции и не зависит от концентрации субстрата/продукта реакции. При работе в динамическом режиме скорость процесса определяется скоростью диффузии к активному центру субстрата/продукта реакции, следовательно, зависит от его концентрации.

2. Градуировочный (калибровочный) график ферментного сенсора строится в координатах концентрация субстрата/продукта - интенсивность сигнала [114].

3. Нижний предел обнаружения - наименьшая концентрация определяемого

вещества, которую возможно обнаружить с помощью данного сенсора с заданной доверительной вероятностью.

4. Чувствительность - минимальное изменение концентрации определяемого вещества, уверенно регистрируемое при помощи данного сенсора.

Помимо этих, общих для аналитических методов характеристик, биосенсоры обладают несколькими специфическими свойствами:

Операционная стабильность сенсоров многоразового использования (reusable) характеризуется остаточной активностью (в % от исходной) после нескольких последовательных измерений, в течение определенного периода времени.

Время жизни - время хранения или работы сенсора, в течение которого происходит уменьшение чувствительности на 10-50%.

Работа биосенсоров первого поколения основана на измерении электрохимического сигнала (тока или напряжения) низкомолекулярного электрохимически активного соединения, которое образуется в процессе каталитической реакции. Например, работа глюкозных биосенсоров основана на генерировании пероксида водорода [116, 117]. Второе поколение биосенсоров - это биосенсоры на основе медиаторного переноса электронов к редокс активным биомолекулам, взаимодействующим с анализируемыми веществами [117]

Третье поколение биосенсоров - безмедиаторные безреагентные системы, в которых происходит прямой перенос или обмен электронами между электродом и ферментом.

По операционной стабильности биосенсоры можно разделить на одноразовые (в том числе биотесты или биоиндикаторы) и многоразовые [25]. Биосенсоры на основе мембранных и митохондриальных цитохромов P450 можно отнести к одноразовым, так как в процессе каталитического цикла происходит самоинактивация гемопротеинов [118]. Бактериальные водорастворимые цитохромы P450 более стабильны и могут быть использованы для конструирования биосенсоров многократного действия. Учитывая широкую субстратную специфичность различных изоформ цитохрома P450, перспективны многоканальные P450-биосенсоры. Такие панели биосенсоров могут быть получены методами трафаретной печати или литографии [119].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Цитохром P450-биосенсоры могут найти применение как альтернативные тест-системы метаболизма лекарственных препаратов, для фармакологических исследований, а также для мониторинга загрязнений окружающей среды [120].

Важным аспектом является скрининг потенциальных субстратов и ингибиторов соответствующих изоформ цитохромов P450 с помощью конкурентного биосенсорного анализа.

Исследование электрохимии гемопротеинов и, в частности, цитохромов P450, послужило основой для исследования более сложных многокомпонентных природных объектов, например, флавогемопротеина цитохрома P450 BM3 (CYP102), содержащего флавиновый и гемовый домен [121].

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства образования и науки РФ НШ-325.2003.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Archakov A.I., Bachmanova G.I.* (1990) Cytochrome P450 and Active Oxygen, Taylor and Francis Eds., London.
2. *Ortiz de Montellano P.R.* (1995) Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry. Second edition. New York, Plenum Press.
3. *Lewis D. F V.* (1996) Cytochrome P450. Structure, Function and Mechanism. Taylor and Francis Eds., London.

4. *Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegerman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.S., Gunsalus I.C., Nebert D.W.* (1996) Pharmacogenetics. **6**, 1-42.
5. *Ortiz de Montellano P.R.* (1998) Acc. Chem. Res., **31**, 543-549.
6. *Eddowes M.J., Hill H.A.O.* (1977) J. Chem. Soc. Chem. Commun., **21**, 771-772.
7. *Yeh P., Kuwana T.* (1977) Chem. Lett. **10**, 1145-1148.
8. *Березин И.В., Богдановская В.А., Варфоломеев С.Д.* (1978) ДАН СССР **240**, 615-618.
9. *Bard A.J., Faulkner L.R.* (1980) Electrochemical Methods, Wiley, New York.
10. *Hill H., Allen O., Walton N.J.* (1982) J. Am. Chem. Soc., **104**, 6515-6519.
11. *Мюр П., Шеллер Ф., Кюн М.* (1982) Прикладная биохимия и микробиология, **18**, 481-488.
12. *Varfolomeev S.D., Kurochkin I.N., Yaropolov A.I.* (1990) Biosens. Bioelectron., **11**, 863-869.
13. *Hill H., Allen O., Page D.J., Walton N.J., Whitford D. J.* (1985) J.Electroanal. Chem., **187**, 315-324.
14. *Armstrong F.A.* (1990) Structure and Bonding, **72**, 137-221.
15. *Scheller F., Renneberg R., Mohr P., Janing G.-R., Ruckpaul K.* (1976) FEBS Letters, **71**, 309-312.
16. *Scheller F., Renneberg R., Strand G., Pommerening K., Mohr P.* (1977) Bioelectrochem. Bioenerg, **4**, 500-507.
17. *Варфоломеев С.Д.* (1978) Итоги науки и техники. Биологическая химия. том 12, ВИНИТИ, М., с.253-267.
18. *Berezin I.V, Varfolomeev S.D.* (1980) Frontiers in Bioorganic Chemistry and Molecular Biology, IUPAC, Pergamon,Oxford.
19. *Hill H. A., Hunt N.I.* (1993) Methods Enzymol., **227**, 501-522.
20. *Armstrong F.A., Hill H., Allen O., Walton N.J.* (1988) Acc. Chem. Res., **21**, 407-413.
21. *Armstrong F.A.* (1992) Adv. Inorg. Chem., **38**, 117-163.
22. *Hill H.A.O.* (1996) Coordination Chemistry Rev: ews, **151**, 115-123.
23. *Suzuki H.* (2000) Electroanalysis, **12**, 703-715.
24. *Downard A.J.* (2000) Electroanalysis, **12**, 1085-1096.
25. *Hara M.* (2000) Material Science and Engineering, **12**, 103-109.
26. *Frew E., Hill H.A.O.* (1988) Eur. J. Biochem., **172**, 261-269.
27. *Guo L.H., Hill H.A.O.* (1991) Advances Inorg. Chem., **36**, 341-375.
28. *Guo L.H., Hill H.A.O., Hopper D.J., Lawrance G.A., Sanghera G.S.* (1990) J.Biol. Chem., **265**, 1958-1963.
29. *Кузнецов Б.А., Местечкина Н.М., Изотов М.В., Карузина И.И., Карякин А.В. Арчаков А.И.* (1979) Биохимия, **44**, 1569-1574.
30. *Dryhurst G., Kadish K.M., Scheller F., Renneberg R.* (1982) Biological Electrochemistry, vol.1, Academic Press, New York, Chapter 7.
31. *Арчаков А.И., Кузнецов Б.В., Изотов М.В., Карузина И.И.* (1981) Биофизика. **26**, 352-354.
32. *Senaratne V., Bowden E.F.* (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun., **157**, 1021-1026.
33. *Armstrong F.A., Hill O., Oliver B.N., Walton N.J.* (1984) J. Am. Chem. Soc., **106**, 921-923.
34. *Kazlauskaite J., Westlake A.C.G., Wong L.L., Hill H.A.O.* (1996) J. Chem. Soc. Chem. Commun., **18**, 2189-2190.
35. *Арчаков А.И., Кузнецов Б.А., Изотов М.В., Карузина И.И.* (1981) ДАН СССР **258**, 216-219
36. *Allen P.M., Hill O., Allen H., Walton N.J.* (1984) J. Electroanal. Chem., **178**, 69-86.
37. *Bond A.M., Hill H.A.O., Page D.J., Psalti I.S.M., Walton N.J.* (1990) Eur. J. Biochem., **191**, 737-742.

38. *Barker P.D., Gleria K.Di, Hill H.A., Lowe V.J.* (1990) Eur. J. Biochem., **190**, 171-175.
39. *Devis J.J,. Coles R.J., Hill A.O.* (1997) J. Electroanal. Chem, **440**, 279-282.
40. *Hagen W.R.* (1989) Eur. J. Biochem., **182**, 523-530.
41. *Taniguchi I., Toyosawa H., Yamaguchi H., Yasukouchi K.* (1982) J. Electroanal. Chem., **140**, 187-193.
42. *Faulkner K.M., Shet M.S., Fisher C.W., Estabrook R.W.* (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 7705-7709.
43. *Wring S.A., Hart J.P., Birch B.J.* (1992) Electroanalysis, **4**, 299.
44. *Bowden E.F., Hawkridge F.M.* (1984) J. Electroanal. Chem., **161**, 355-376.
45. *Bachmann T.T., Leca B., Vilatte F., Marty J.-L., Fournier D., Schmid R.D.* (2000) Biosens. Bioelectron, **15**, 193-201.
46. *Imai M., Shimada H., Watanabe Y., Matsushima-Hibiya Y., Makino R., Koga H., Horiuchi T., Ishimura Y.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 7823-7827.
47. *Sugihara N, Ogoma Y., Abe K., Kondo Y., Akaike T.* (1998) Polym. Adv. Technol., **9**, 307-313.
48. *Sugihara N., Ogoma Y., Abe K., Murakami Y., Kondo Y., Akaike T.* (1998) Polym. Adv. Technol., **9**, 858-860.
49. *Жуков А.А., Арчаков А.И.* (1985) Биохимия, **50**, 1939-1952.
50. *Fisher C.R., Shet M.S., Estabrook R.W.* (1996) Methods Enzymol., **272**, 15-25.
51. *Estabrook R.W., Shet M.S., Fisher C.W., Jenkins C.M., Waterman M.R.* (1996) Arch. Biochem. Biophys., **333**, 308-315.
52. *Estabrook R.W., Faulker K.M., Shet M.S., Fisher C.W.* (1996) Methods Enzymol., **272**(B), 44-51.
53. *Estabrook R.W., Shet M.S., Faulker K.M., Fisher C.W.* (1996) Endocrine Res., **22**, 665-671.
54. *Гурьев О.Л., Гилевич С.Н., Чащин В.Л.* (1990) Биохимия. **55**, 1553-1560
55. *Shumyantseva V.V., Uvarov V.Yu., Byakova O.E., Archakov A.I.* (1998) Arch. Biochem. Biophys, **354**, 133-138.
56. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Alexandrova S.A., Sokolov N.N., Schmid R.D., Bachmann T., Archakov A.I.* (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun., **263**, 678-680.
57. *Shumyantseva V.V, Bulko T.V, Bachmann T., Bilitewski U., Schmid R.D., Archakov A.I.* (2000) Arch. Biochem. Biophys, **377**, 43-48.
58. *Marcus R.A., Sutin N.* (1985) Biochim. Biophys. Acta, **811**, 265-322.
59. *Heller A* (1990) Acc. Chem Res., **23**, 128-134.
60. *Kulys J., D.,Costa E.J.* (1991) Biosens. Bioelectron., **6**, 109-115.
61. *Bachmann T.T., Schmid R.D.* (1999) Anal. Chem., **401**, 95-103.
62. *Reipa V., Mayhew M., Vilker V.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**, 13554-13558.
63. *Lo K.K-W., Wong L-L., Hill H.A.O.* (1999) FEBS Letters, **451**, 342-346.
64. *Di Gleria K., Hill H.A. O., Wong L.L.* (1996) FEBS Letters, **390**, 142-144.
65. *Di Gleria K., Nickerson D.P., Hill H.A. O., Wong L.L., Fulop V.* (1998) J. Am. Chem. Soc., **120**, 46-52.
66. *Clark L.C., Jr., Lyons C.* (1962) Ann. NY. Acad. Sci., 102, 29-45.
67. *Rusling J.F.* (1998) Acc. Chem. Res., **31**, 363-369
68. *Willner I., Katz E.* (2000) Angew. Chem. Int. Ed., **39**, 1180-1218.
69. *Cosnier S.* (1999) Biosens. Bioelectron. **14**, 443-456.
70. *Gerard M., Chaubey A., Malhotra B. D.* (2002) Biosens. Bioelectron., **17**, 345-359.
71. *Shuhmann W., Wohlschlager H., Huber J., Schmidt H.-L., Stadler H.* (1995) Anal. Chim. Acta., **315**, 113-122.
72. *Зубов В.П., Иванов А.Е., Жигис Л.С., Раппопорт Е.М., Марквичева Е.А., Лукин Ю.В., Зайцев С.Ю.* (1999) Биоорг. химия, **25**, 868-880.

73. *Guo Y., Dong S.* (1997), Anal. Chem., **69**, 1904-1908.
74. *Iwuoha E.I., Smyth M.R.* (2003) Biosens. Bioelectron. **18**, 237-244.
75. *John R., Spencer M., Wallace G.G., Smyth M.R.* (1991) Anal. Chim. Acta. **24**, 381-385.
76. *Rainina, Efremenco E.N., Varfolomeyev S.D.* (1996) Biosens. Bioelectron., **11**, 991-1000.
77. *Евтюгин Г.А., Будников Г.К., Николаев Е.Б.* (1999) Усп. химии, **68**, 1142-1167.
78. *Zhang Z., Nassar A.F., Lu Z., Schenkman J.B., Rusling J.F.* (1997) J. Chem. Soc., Faraday Trans., **93**, 1769-1774.
79. *Rusling J.F., Nassar A-E. F.* (1993) J. Am. Chem. Soc., **115**, 11891-11897.
80. *Iwuoha E. I., Joseph S., Lung Z., Smyth M.R., Fuhr U., Demontellano P. R.O.* (1998) J. Pharm. Biomed. Anal., **17**, 1101-1110.
81. *Aguey-Zinsou K.., Bernhardt P.V., De Voss J.J., Slessor K.E.* (2003) Chem. Commun., **3**, 418-419.
82. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Schmid R.D., Nicolini C., Archakov A.I.* (2001) J. Inorg. Biochem., **87**, 185-190.
83. *Ruerup J., Lauer F., Drewes A, Wray V, Schmid R.D.* (1994) Chem. Phys. Lipids, **72**, 175-183.
84. *Shumyantseva V. V., Bulko T.V., Archakov A.I.* (2003) 13th International Conference on Cytochrome P450. Biochemistry, Biophysics and Drug Metabolism. Prague, Czech Repablic, Abstracts, S120, TP12
85. *Shumyantseva V.V,. Deluca G., Bulko T.V., Carrara S., Nicolini C., Usanov S. A., Archakov A.I.* (2004) Biosens. Bioelectron., **19**, 971-976.
86. *Lvov Y.M., Lu Z., Schenkman J. B., Zu X., Rusling J.F.* (1998) J. Am. Chem. Soc. **120**, 4073-4080.
87. *Zu X., Zu Z., Zhang Z., Schenkman J., Rusling J.* (1999) Langmuir, **15**, 7372-7377.
88. *Chen X., Hu N., Zeng J., Rusling J., Yang J.* (1999) Langmuir, **15**, 7022-7030.
89. *Joseph S, Rusling J.F., Lvov Y M, Friedberg T, Fuhr U.* (2003) Biochem. Pharmacol., **65**, 1817-1826.
90. *Iwuoha E., Kane S., Ania C., Smyth M., Ortiz de Monlellano P.* (2000) Electroanalysis, **12**, 980-988.
91. *Armon R., Starosvetzky J., Saad I.* (2000) J. Sol-Gel Sci. Technol., **19**, 289-292.
92. *Dave B.C., Dunn B., Valentine J.S., Zink J.I.* (1994) Anal. Chem. **66**, 1120A-1127A.
93. *Zarzycki J.* (1997) J. Sol-Gel Sci. Technol., **8**, 17-22.
94. *Glezer V., Lev O.* (1993) J. Am. Chem. Soc., **115**, 2533-2534.
95. *Hara M., Yasyda Y., Toyatama H., Ohkawa H., Nazawa T., Miyake J.* (2002) Biosens. Bioelectron., **17**, 173-179.
96. *Ghosh P.K., Bard A.J.* (1983) J. Am. Chem. Soc., **105**, 5691-5696.
97. *Lei C, Wollenberger U., Bistolas N, Guiseppi-Elie A., Scheller F.W.* (2002) Anal Bioanal. Chem., **372**, 235-239.
98. *Navratilova Z., Kula P.* (2003) Electroanalysis, **15**, 837-846.
99. *Munge B., Estavillo O., Schenkman J.B., Rusling J.F.* (2003) Chembiochem., **4**, 82-89.
100. *Rusling J.F.* (2000) Protein Architecture: Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Biotechnology, Marcel Dekker, New York, pp. 337-354.
101. *Rusling J.F., Zhang Z.* (2001) Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials, Vol. 5, Biomolecules, Biointerfaces, and Applications, Academic Press, San Diego, pp. 33-71.
102. *Lei C., Wollenberger U., Jung C., Scheller F.W.* (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun., **268**, 740-744.
103. *Шумянцева В.В., Булко Т.В., Арчаков А.И.* (2003) 2-ой Международный Конгресс "Биотехнология - состояние и перспективы развития". (часть 2). Москва, Россия, с. 191-192.

104. *Kiselyova O.I., Yaminsky I.V., Ivanov Y.D., Kanaeva I.P., Kuznetsov V.Y., Archakov A.I.* (1999) Arch. Biochem. Biophys., **371**, 1-7.
105. *Han X., Chen W., Zhang Z., Dong S., Wang E.* (2002) Biochem. Biophys. Acta, **1556**, 273-277.
106. *Ribrioux S., Kleymann G., Haase W., Heitmann K., Ostermeier C., Michel H.* (1996) J. Histochem.Cytochem. **44**, 207-213.
107. *Penn S.G., He L., Natan M.J.* (2003) Current Opinion in Chemical Biology, **7**, 1-7.
108. *Riley D.J.* (2002) Current Opin. Colloid Interface Sci. **7**, 186-192.
109. *Cheng W., Dong S., Wang E.* (2002) Langmuir, **18**, 9947-9952.
110. *Broun K.R., Fox A.P., Natan M. J.* (1996) J. Am. Chem. Soc., **118**, 1154-1157.
111. *Han X., Cheng W., Zhang Z., Dong S., Wang E.* (2002) Biochem. Biophys. Acta, **1556**, 273-277.
112. *Bethell D., Brust M., Schiffin D. J., Kiely C.* (1996) J. Electroanal. Chem., **409**, 137-143.
113. *Fantuzzi A., Fairhead M., Gilardi G.* (2004) J. Am. Chem. Soc. **126**, 5040-5041.
114. *Карякин А.А., Уласова Е.А., Вагин М.Ю., Карякина Е. Е.* (2002) Сенсор, **1**, 16-24.
115. *Тернер Э., Каруб И., Уилсон Дж.* (ред) (1992) Биосенсоры. Основы и приложения Мир, Москва.
116. *Scheller F.W., Schubert F., Neumann B., Pfeiffer D., Hintsche R., Dransfeld I., Wollenberger U., Renneberg R., Warsinke A.* (1991). Biosensors. Bioelectron., **6**, 245-253.
117. *Scheller F.W., Wollenberger U., Warsinke, Lisdat F.* (2001) Current Opin. Biotechnol. **12**, 35-40.
118. *Karuzina I.I, Zgoda V.G., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Archakov A.I.* (1999) Free Rad. Biol. Med., **26**, 620-632.
119. *Turner P.* (2000) Science, **290**, 1315-1317.
120. *Gilardi G., Fantuzzi A.* (2002) Trends in Biotechnol., **19**, 468-476.
121. *Fleming B.D., Tian Y., Bell S. G., Wong L-L., Urlacher V., Hill A.O.* (2003) Eur.J. Biochem. **270**, 4082-4088.

Поступила 17.10 2003

ELECTROCHEMICAL REDUCTION OF CYTOCHROME P450 AS A WAY FOR CONSTRUCTION OF BIOSENSORS AND BIOREACTORS.

Victoria V. Shumyantseva, Tatiana V. Bulko, Alexander I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry, 10, Pogodinskaya st., Moscow, 119121 Russia, tel.: 7 (095) 246-58-20, fax: 7(095) 245-08-57, e-mail: victoria@ibmh.msk.su

The present review describes the data on electrochemical reduction of cytochrome P450. Three generations of enzyme biosensors have been considered. The concept and potentialities of enzyme electrodes - transducers - as the main element on construction of electrochemical biosensors are described. Different types of electrodes for bioelectrochemistry are presented. New experimental approaches for immobilisation of cytochrome P450 based on nanotechnology are reported. Nanobiotechnology in electrochemistry has potential application for production of biosensors and bioreactors for medicine.

Key words: cytochrome P450, bioelectrochemistry, biosensors, nanotechnology, enzime electrodes, electron transfer