

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.015:577,152.162,08  
©Коллектив авторов

### НАНОЭЛЕКТРОХИМИЯ ЦИТОХРОМОВ P450: ПРЯМОЙ ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНОВ И ЭЛЕКТРОКАТАЛИЗ

**В.В. Шумянцева, Т.В. Булко, Ю.О. Рудаков, Г.П. Кузнецова, Н.Ф. Саменкова,  
А.В. Лисица, И.И. Карузина, А.И. Арчаков**

Государственное учреждение научно-исследовательский институт  
биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва,  
ул. Погодинская, д. 10, тел.: 7 (495) 246-58-20; факс: 7 (495) 245-08-57;  
эл.почта: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Продemonстрирован прямой перенос электронов между цитохромом P450 2B4 (CYP2B4), P450 1A2 (CYP1A2), стерол-14 $\alpha$ -деметилазой (CYP51MT) и графитовыми печатными электродами, модифицированными наночастицами золота и дидодецилдиметиламмоний бромидом (DDAB). Предложенный метод получения ферментных наноструктурированных электродов позволяет проводить электродетекцию гемопротейна при адсорбции 2–200 пмоль P450/электрод. Транспорт электронов, прямое электрохимическое восстановление и взаимодействие с субстратами цитохромов P450 (кислородом, бензфетамином, ланостеролом) и ингибитором кетоконазолом исследовали методами цикловольтамперометрии, квадратно-волновой вольтамперометрии, дифференциальной импульсной вольтамперометрии, амперометрии.

**Ключевые слова:** цитохром P450 2B4, P450 1A2, стерол-14 $\alpha$ -деметилаза из *Mycobacterium tuberculosis* (CYP51MT, P45014DM), ланостерол, кетоконазол, печатные электроды, биоэлектрохимия, наночастицы золота, наноструктурированные электроды.

**ВВЕДЕНИЕ.** Нанотехнологические подходы при исследовании биологических объектов начинают занимать лидирующие позиции в биохимии [1]. Современные нанотехнологии сочетают избирательность и специфичность классической биохимии, а также использование малых объемов проб и предельно низких концентраций анализируемых биологических объектов. Цитохромы P450 играют важную роль в живых организмах при детоксификации биологически активных соединений и гидрофобных ксенобиотиков, 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.) [2, 3]. Прогнозирование метаболических превращений физиологически активных соединений и исследование потенциальных путей метаболизма проводится как с помощью компьютерных методов [4], так и экспериментальным путем с помощью ферментных систем организма *in vitro* [5]. Наиболее перспективными в этом плане являются электрохимические системы на основе рекомбинантных форм цитохромов P450, позволяющие стандартизировать формат анализа [6-9].

Цитохром P450 2B4, исследованный в данной работе, с одной стороны, метаболизирует широкий круг соединений, с другой стороны - имеет маркерный

субстрат – бензфетамин. Этот лекарственный препарат метаболизируется (N-деметируется) только цитохромами семейства 2B [3, 10]. Цитохром P450 1A2 метаболизирует 106 субстратов, из которых 72 – вещества, широко используемые лекарства, такие как кофеин, парацетамол, фенацетин [10].

Цитохромы P450, катализирующие отщепление 14-альфа-метильной группы стероидных субстратов, объединены в семейство CYP51. В настоящее время это семейство содержит 42 фермента. Хорошо известна роль стероловых деметираз у эукариот (участие в биосинтезе холестерина), растений (синтез фитостерина) и грибов (синтез эргостерина) [11].

Исследование каталитической активности надсемейства изолированных цитохромов P450 требует обязательного присутствия белков редокс-партнеров и доноров электронов (NADPH) [2, 3]. При электрохимическом восстановлении гемопротеинов семейства цитохромов P450 редокс-партнеры не являются необходимыми, что существенно упрощает каталитическую систему. Электрохимический подход особенно важен, когда физиологические партнеры цитохромов P450 неизвестны, как в случае CYP51MT [11]. Электрохимические системы выполняют двойную функцию: заменяют белки-партнеры и являются источником электронов для окислительно-восстановительных ферментов.

Актуальность такого подхода связана с перспективой использования цитохромов P450 и ферментных электродов на их основе в качестве биосенсоров в персонализированной медицине, при скрининге новых лекарственных препаратов (high-throughput screening), исследовании лекарственной интерференции [12-14].

Для проведения электрохимических экспериментов по восстановлению цитохромов P450 нами были использованы трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати. Преимущества печатных электродов – миниатюризация электроанализа, возможность модификации рабочей поверхности электродов, низкий фоновый ток, широкий диапазон рабочих потенциалов [15]. Дизайн поверхности электродов является существенным фактором при исследовании прямого переноса электронов в гетерофазной реакции между твердым электродом и коллоидным раствором белка на поверхности электрода. Мембраноподобные синтетические поверхностно-активные вещества (дидодецилдиметиламмоний бромид DDAB, дигексадецилфосфат, лецитин, димиристоилфосфатидилхолин) образуют стабильные мезопористые жидко-кристаллические пленки на поверхности электродов [16-18]. Такие мембранные пленки содержат достаточное количество воды для поддержания структуры и активности белков на поверхности электродов. При модификации стеклоглеродных или пирографитовых электродов такими пленками был продемонстрирован прямой перенос электронов между гемопротеинами миоглобином [19, 20], гемоглобином [21], пероксидазой [22], цитохромом P450кам [23], цитохромом P450 BM3 [24, 25], цитохромами семейства 2C [26, 27]. Для получения систем нанoeлектродов на основе золотых наночастиц на поверхности электрода мы использовали метод получения коллоидного раствора золота, стабилизированного DDAB.

Цель данной работы - получить и исследовать наноструктурированные электроды (интерфейсные наносистемы) для прямого электрохимического восстановления и электрокатализа цитохромов P450.

#### **МЕТОДИКА.**

*Оборудование.* Спектральные исследования проводили с помощью Cary 100 Scan UV-Vis спектрофотометра. Электрохимические измерения проводили с помощью потенциостата AUTOLAB (“Eco Chemie”, Нидерланды), снабженного программным обеспечением GPES. Все измерения проводили при комнатной температуре. Электрохимические исследования цитохромов P450 2B4 и 1A2 проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 0,05М NaCl, pH 7,4. Электрохимические исследования CYP51MT в 0,1 М калий-фосфатном буфере,

содержащем 0,04% тритон X-100, pH 7,4. В работе использовали трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО НПП “ЭЛКОМ”, Россия); с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами (графит фирмы “Atchison”), и хлорсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода 2 мм. Цикловольтамперограммы (CV) регистрировали при скорости сканирования от 10 до 100 мВ/с. Параметры, используемые при исследовании квадратно-волновой вольтамперометрии: (SWV) начальный потенциал 100 мВ, конечный потенциал –600 мВ, шаг потенциала 5 мВ, амплитуда 20 мВ, частота от 10 до 100 Гц. Параметры, используемые при дифференциальной импульсной вольтамперометрии (DPV): амплитуда импульса 25 мВ, начальный потенциал 100 мВ, конечный потенциал –600 мВ, шаг потенциала 1 мВ, продолжительность импульса 50 мс.

**Реагенты.** В работе использовали следующие реактивы: дидодецилдиметиламмоний бромид (DDAB) – фирмы “Fluka” (Швейцария),  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -боргидрид натрия, ланостерол, кетоконазол, тритон X-100 - фирмы “Sigma-Aldrich” (США).

В электрохимических экспериментах использовали свежеприготовленный 1 мМ ланостерол в изопропанол, 3,6 мМ кетоконазол в смеси ацетон-диметилформамид (1:1).

**Синтез коллоидного раствора золота (наночастиц золота), стабилизированного DDAB.** К 1 мл 0,1 М DDAB в хлороформе прибавляли при интенсивном перемешивании 0,5 мл 10 мМ водного раствора  $\text{HAuCl}_4$ . При интенсивном перемешивании медленно прибавляли свежеприготовленный водный раствор  $\text{NaBH}_4$  (0,2 мл 0,4 М). Через 2 часа окрашенный органический слой отделяли. Коллоидный раствор золота, стабилизированный DDAB в хлороформе, был охарактеризован спектрально:  $\lambda_{\text{max}}=520$  нм [28, 29]. Концентрацию наночастиц золота в 0,1 М DDAB в хлороформе рассчитывали в соответствии со стехиометрией реакции (5 мМ).

Цитохром P450 2B4 (CYP2B4) (17-18 нмоль/мг,  $A_{418}/A_{278} = 1,5$ ) был выделен из микросом печени кроликов, индуцированных фенobarбиталом, и очищен, как описано ранее [30]. Концентрацию цитохрома P450 2B4 определяли по образованию комплекса восстановленной формы с оксидом углерода, используя коэффициент экстинкции  $\epsilon_{450} = 91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [31]. Цитохром P450 1A2 (CYP1A2) (10-12 нмоль/мг,  $A_{393}/A_{278} = 0,9$ ) был выделен из микросом печени кроликов, индуцированных метилхолантеном [32]. Концентрацию цитохрома P450 1A2 (10-12 нмоль/мг) определяли по образованию комплекса восстановленной формы с оксидом углерода, используя коэффициент экстинкции  $\epsilon_{450} = 104 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [33].

В работе использовали 100 мкМ цитохром P450 2B4 и 96 мкМ цитохром P450 1A2.

CYP51MT был любезно предоставлен В.М. Говоруном (НИИ физико-химической медицины). В работе использовали 20 мкМ CYP51MT [34].

**Приготовление электродов.** На поверхность рабочего графитового электрода наносили 2 мкл 0,1 М DDAB в хлороформе или 2 мкл 5 мМ коллоидного раствора золота в 0,1 М DDAB в хлороформе, после испарения хлороформа (10 мин.) наносили 2 мкл исследуемого гемопотеина. Электроды оставляли на 12 часов при +4°C во влажной камере, предотвращающей полное высыхание электродов.

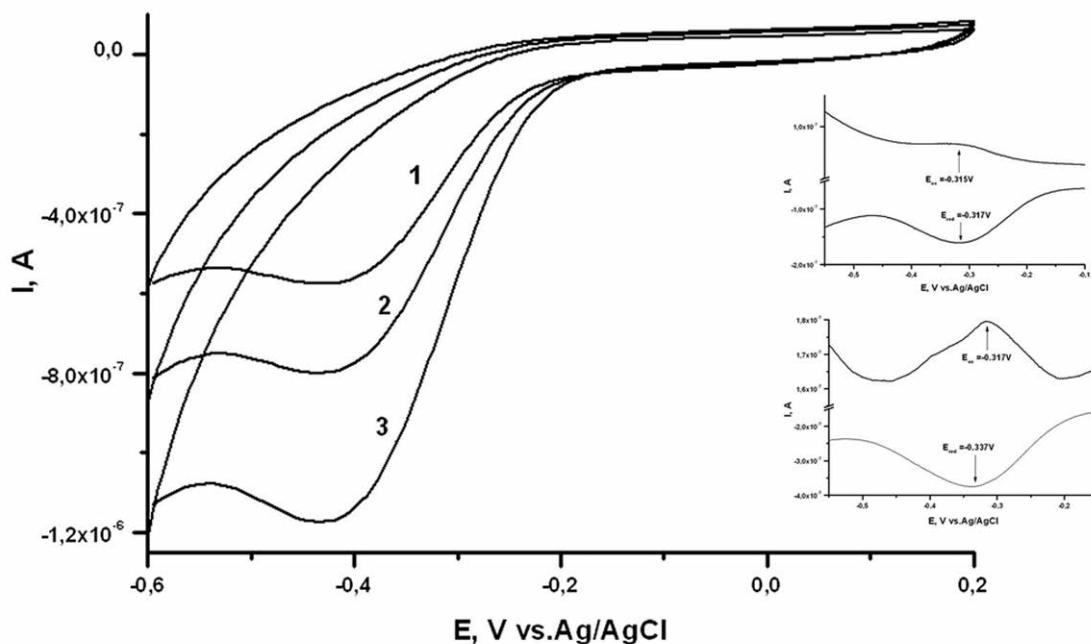
Для экспериментов в анаэробных условиях аргон пропускали в буферный раствор электролита и анализируемый раствор фермента в течение 30 минут.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** При модификации поверхности печатных графитовых электродов 0,1 М DDAB в хлороформе с последующим включением в мембраноподобную матрицу цитохрома P450 2B4 наблюдается прямой безмедиаторный перенос электронов между электродом и гемом.

На рисунке 1 представлены цикловольтамперограммы DDAB/P450 2B4 в анаэробных условиях (аргон) и аэробных условиях. Соотношение каталитического тока (в присутствии кислорода) и диффузионного тока (аргон) составляет

## НАНОЭЛЕКТРОХИМИЯ ЦИТОХРОМОВ P450

$I(O_2)/I(Ar) = 2,05$  при скорости сканирования 50 мВ/с. Интегрирование восстановительного пика позволяет рассчитать количество электроактивных молекул на поверхности электрода. При нанесении на электрод 0,2 нмоль P450 2B4 электроактивны 5-15% (расчет по восстановительному пику в анаэробных условиях). Следовательно, возможно нанесение меньших количеств цитохрома P450. Были исследованы трансдюсеры с 20 пмоль P450 2B4/электрод (30-40% электроактивных молекул) и с 2 пмоль P450 2B4/электрод (электроактивны практически 100% фермента).



**Рисунок 1.**

Циклическая вольтамперограмма печатных электродов (DDAB/P450 2B4 в анаэробных условиях (1), (DDAB/P450 2B4 в аэробных условиях, 1 мин. (2), (DDAB/P450 2B4 в аэробных условиях, 20 мин. (3). Скорость сканирования 50 мВ/с. Объем электролита 1000 мкл, 100 мМ калий-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, pH 7,4.

**Вставка (верх).** Квадратно-волновые вольтамперограммы DDAB/P450 2B4 электрода в анаэробных условиях. Объем электролита 1000 мкл, 100 мМ калий-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, pH 7,4. Частота 10 Гц.

**Вставка (низ).** Дифференциальная импульсная вольтамперограмма DDAB/P450 2B4 электродов в анаэробных условиях.

Так как кислород является косубстратом цитохрома P450, был проведен расчет количества кислорода, участвующего в электрокаталитической реакции восстановления кислорода. В анаэробных условиях восстанавливается 0,024 нмоль P450/электрод, а в аэробных – 0,046 нмоль/электрод, из чего следует, что количество восстановленного кислорода составляет 0,022 нмоль/электрод, т.е. соотношение P450:кислород близко к стехиометрическому  $0,024:0,022 = 1:1,1$  в соответствии с механизмом катализа цитохрома P450 [2, 3].



Более чёткие результаты продемонстрированы с помощью вольтамперометрического анализа: квадратно-волновой (SWV) [35, 36] и дифференциальной импульсной вольтамперометрии, имеющих большую чувствительность и дающих лучшее соотношение шум – сигнал [35, 37]. На рисунке 1 (вставки) представлены квадратно-волновая (SWV) и дифференциальная импульсная вольтамперограммы (DPV) DDAB/P450 2B4 электродов в анаэробных условиях. По данным SWV окислительно-восстановительный потенциал (полупотенциал) пары  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$   $E_{1/2} = -327$  мВ (относительно Ag/AgCl), с  $E = 20$  мВ. Максимальный ток SW вольтамперограмм пропорционален частоте в диапазоне 10–50 Гц. По данным DPV, окислительно-восстановительный потенциал  $E_{1/2}$  имеет близкое значение и соответствует  $-316$  мВ.

Субстратом цитохрома P450 2B4 является бензфетамин. Эффективность такого типа электродов, выраженная как отношение максимального тока без и в присутствии субстрата, составляет  $I(\text{Bz})/I(\text{O}_2) = 1,29$  при скорости сканирования цикловольтамперометрии 100 мВ/с. Эта величина сравнима с эффективностью по отношению к аминопирину этой же изоформы, включенной в наночастицы алюмосиликатов,  $-1,18$  [38], и с активностью P450 3A4 в полиионных пленках по отношению к верапамилу  $-1,38$  [39]. Смещение восстановительного потенциала DDAB/P450 2B4 в присутствии бензфетамина, по данным CV, составляет 34 мВ, что согласуется с данными потенциометрического титрования [40, 41].

Наночастицы металлов (золота, серебра, палладия) используются в биоэлектрохимии для обеспечения эффективного транспорта электронов между электродом и биополимерами (белками, нуклеиновыми кислотами) [42]. Неорганические наноструктуры (наночастицы металлов) и наноразмерные биомолекулы, к которым относятся и белки, имеют характерные размеры 1-100 нм [43-47].

Сочетание мембраноподобных жидкокристаллических пленок и наночастиц металлов позволяет получать стабильные пленки с высокой способностью к переносу электронов между электродом и гемопротеином [29, 48]. Это связано с тем, что наночастицы металлов на электроде ведут себя как системы нанозлектродов [45].

При восстановлении золототетрахлорводородной кислоты  $\text{HAuCl}_4$  в присутствии 0,1 М DDAB в хлороформе нами был получен коллоидный раствор золота (наночастицы золота). Такой модификатор графитовых электродов служит удобной и стабильной матрицей для включения белка. Ранее наночастицы золота, стабилизированные алкантиолами, были использованы нами для электрохимического восстановления цитохрома P450<sub>scc</sub>, субстратом которого является холестерин [48].

Наночастицы золота, стабилизированные синтетическим мембраноподобным веществом поликатионной природы DDAB, эффективно катализировали прямой перенос электронов между электродом и цитохромом P450 2B4. На рисунках 2а и 2б представлены цикловольтамперограммы DDAB/P450 2B4 и DDAB/Au/P450 2B4 электродов в аэробных и анаэробных условиях. В анаэробных условиях восстановительный пик более четкий, чем окислительный, по-видимому, в связи с остаточным количеством кислорода (рис. 2б). Сравнительные цикловольтамперограммы DDAB/P450 2B4 и DDAB/Au/P450 2B4 электродов (рис. 2а) показывают, что при использовании золотых наночастиц возрастает амперометрический ответ системы. В присутствии кислорода в аэробных условиях восстановительный пик возрастает и окислительный полностью исчезает. Эти эксперименты доказывают электрокаталитическую активность P450 2B4 по отношению к кислороду, так как восстановленная форма P450 (ферроцитохром  $\text{Fe}^{2+}$ ) с высокой скоростью связывает кислород ( $k > 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  [2, 3]).

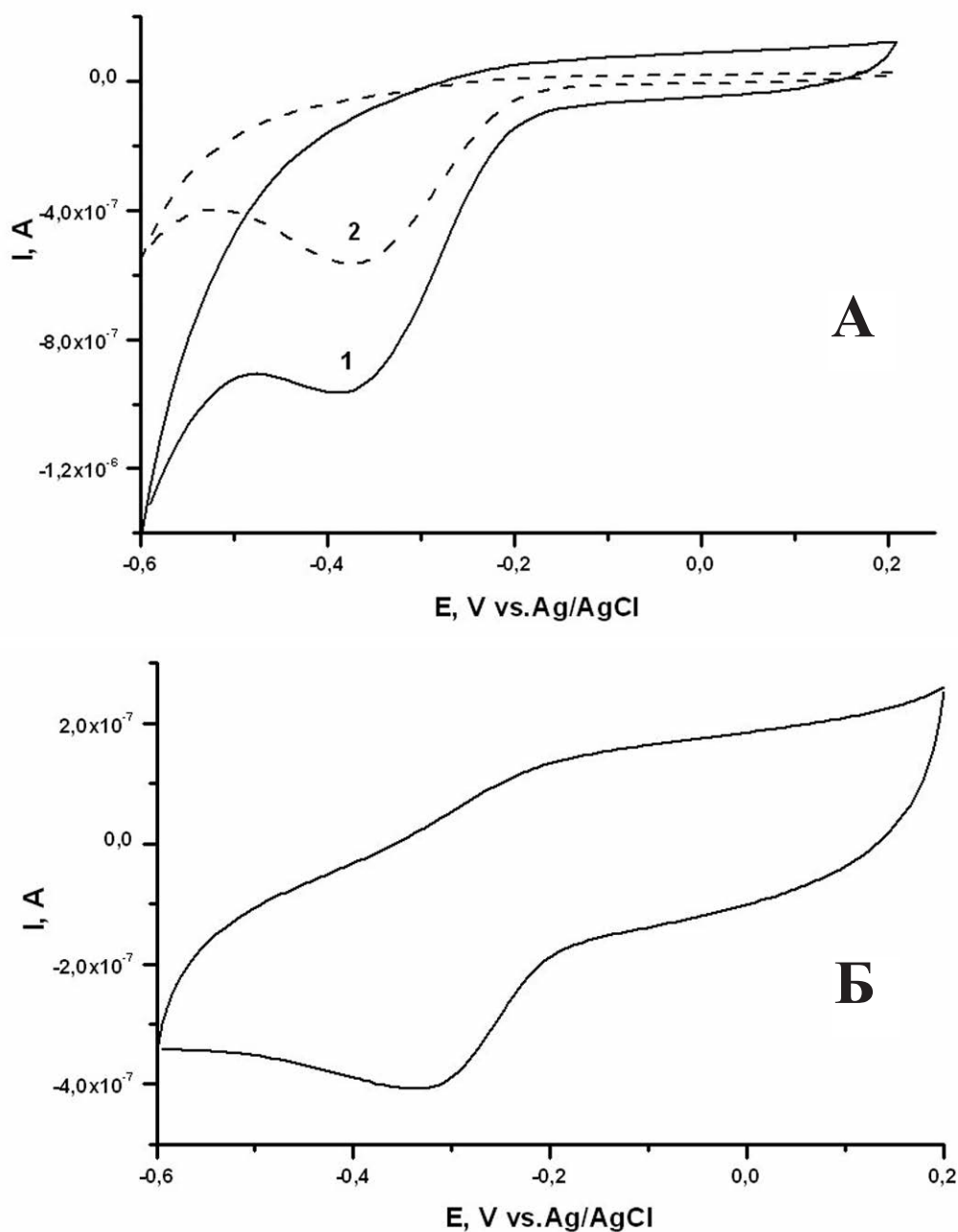


Рисунок 2.

А). Циклическая вольтамперограмма (DDAB/Au/P450 2B4 электрода (1) и DDAB/P450 2B4 в аэробных условиях (2). Скорость сканирования 100 мВ/с. Объем электролита 1000 мкл, 100 мМ калий-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, pH 7,4.

Б). Циклическая вольтамперограмма DDAB/Au/P450 2B4 электрода в анаэробных условиях. Скорость сканирования 50 мВ/с. Объем электролита 1000 мкл 100 мМ калий-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, pH 7,4.

Цикловольтамперограммы DDAB/Au/P450 2B4 и DDAB/Au/P450 1A2 электродов (рис. 3) в аэробных условиях демонстрируют восстановительные пики в характерной для гемопротеинов области  $E_{pc}$  (P450 1A2) = -437 мВ,  $E_{pc}$  (P450 2B4) = -393 мВ. По данным SWV, окислительно-восстановительный потенциал (полупотенциал) P450 1A2  $E_{1/2}$  = -382 мВ (относительно Ag/AgCl), с  $\Delta E$  = 20 мВ, по данным DPV,  $E_{1/2}$  = -370 мВ.

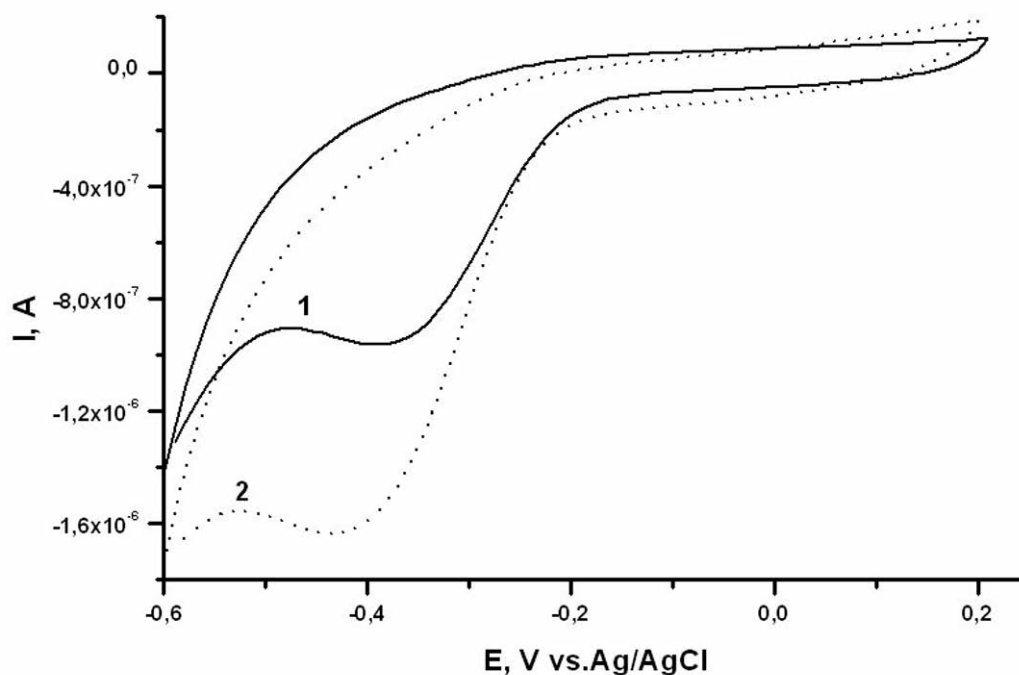


Рисунок 3.

Циклическая вольтамперограмма DDAB/Au/P450 2B4 (1) и DDAB/Au/P450 1A2 (2) электродов в аэробных условиях. Скорость сканирования 100 мВ/с. Объем электролита 1000 мкл 100 мМ калий-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, pH 7,4.

Таким образом, наночастицы золота, стабилизированные синтетическим мембраноподобным веществом DDAB, обеспечивают эффективный электронный транспорт между графитовым электродом и гемом цитохромов P450. Мембрана синтетического липида с коллоидным золотом DDAB/Au обеспечивает фиксацию ферментов на графитовом печатном электроде. DDAB/Au/P450 2B4 и DDAB/Au/P450 1A2 электроды имеют стабильные электрохимические параметры, что позволяет использовать такие химически модифицированные электроды в качестве трансдьюсеров при конструировании P450-биосенсоров.

Необходимо отметить, что значения редокс потенциалов цитохромов P450 2B4 и 1A2, полученные нами, находятся в соответствии с ранее опубликованными значениями, полученными различными методами: по данным цикловольтамперометрии [38, 48, 49] или с помощью потенциометрического титрования [40].

Эффективность DDAB/Au/P450 2B4 электрода по отношению к бензфетамину  $I(Bz)/I(O_2)=1,34$  при скорости сканирования цикловольтамперометрии 100 мВ/с. Как и в случае DDAB/P450 2B4 электродов, по данным CV (рис. 4) и DPV (рис. 4, вставка), бензфетамин не вызывает существенного смещения восстановительного потенциала цитохрома P450 2B4, включенного в DDAB/Au. Чувствительность DDAB/P450 2B4 электродов по отношению к бензфетамину составляет 0,6 нА/мкмоль, а DDAB/Au/P450 2B4 электродов 1,9 нА/мкмоль, с пределом детекции 40–60 мкМ бензфетамина.

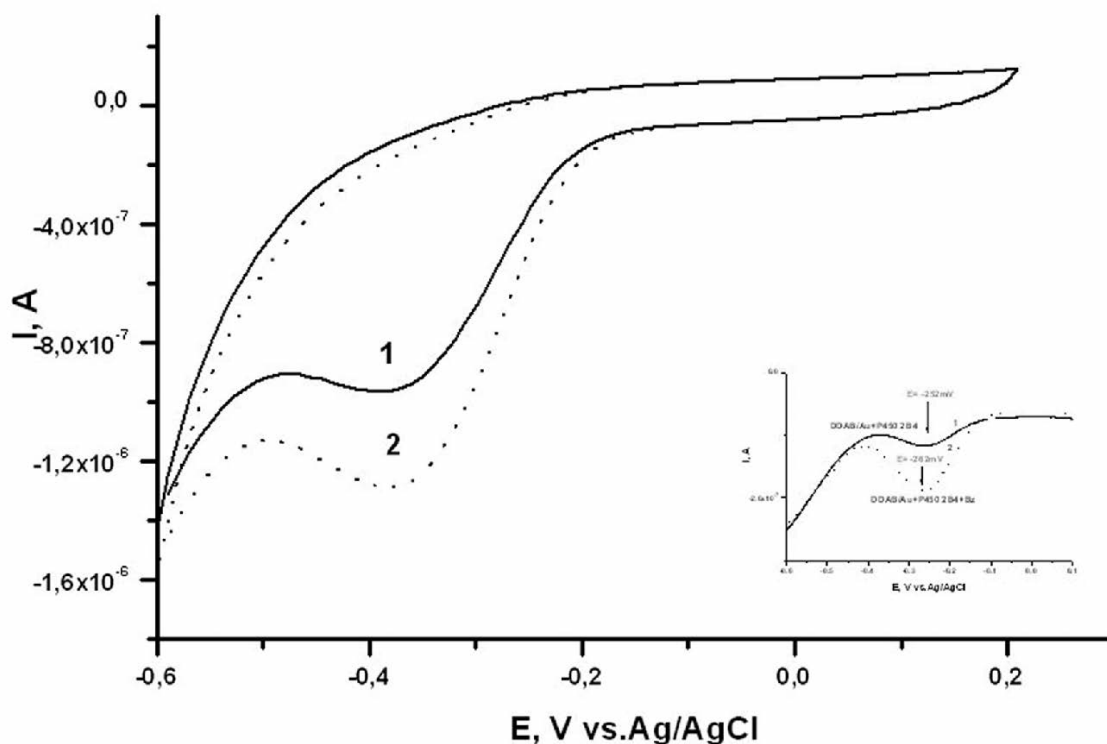


Рисунок 4.

Циклическая вольтамперограмма DDAB/Au/P450 2B4 электродов до (1), и после прибавления 15 мкл 50 мМ бензфетаминa Bz (2). Скорость сканирования 100 мВ/с. Объем электролита 1000 мкл 100 мМ калий-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, pH 7,4.

**Вставка.** Дифференциальная импульсная вольтамперограмма печатных электродов (DDAB/Au+P450 2B4 0,2 нмоль/электрод) в аэробных условиях, до (1) и после прибавления 15 мкл 50 мМ Bz, (2).

Как и DDAB/P450 2B4 электроды, DDAB/Au/P450 2B4 электроды электроактивны при нанесении пикомолярных количеств фермента на электрод.

На рисунке 5 представлены цикловольтамперограммы DDAB/Au/CYP51 в анаэробных условиях (аргон). По данным цикловольтамперометрии (CV), окислительно-восстановительный потенциал (полупотенциал) пары  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$   $E_{1/2} = -273$  мВ (относительно Ag/AgCl), с  $\Delta E = 159$  мВ). В интервале скоростей сканирования 10-100 мВ/с наблюдается линейная зависимость амплитуды тока от скорости развертки, что типично для окислительно-восстановительных процессов на поверхности электрода [50] (рис. 5). Интегрирование восстановительных пиков в анаэробных условиях позволяет рассчитать количество электроактивных частиц на электроде. При нанесении на электрод 40 пмоль CYP51MT (2 мкл 20 мкМ раствора) электроактивны 1,7 пмоль гемопroteина (4%). Цикловольтамперограмма DDAB/Au/CYP51MT в присутствии субстрата ланостерола (рис. 5) в аэробных условиях подтверждает фермент-субстратное взаимодействие. Эффективность электрокатализа по отношению к ланостеролу составляет  $I(\text{O}_2)/I(\text{Lan}) = 1,15$  при скорости сканирования 50 мВ/с. Кетоконазол является ингибитором CYP51MT с  $K_S = 5$  мкМ [11]. Кетоконазол не дает существенного изменения амплитуды тока DDAB/Au/CYP51MT) электрода (рис. 5, вставка), что типично для поведения ингибиторов в электрохимических системах [26, 49].



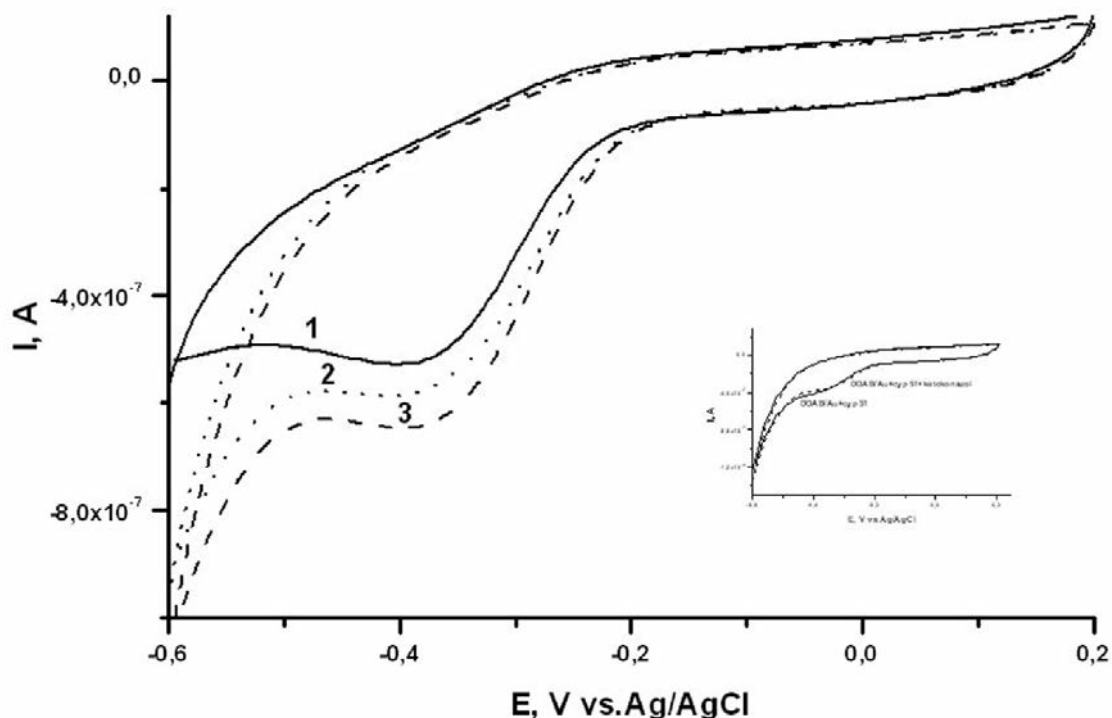


Рисунок 5.

Циклическая вольтамперограмма DDAB/Au/CYP51MT электрода в анаэробных условиях (аргон) (1), в аэробных условиях (2), в присутствии ланостерола (10 мкМ в пробе) (3). Скорость сканирования 50 мВ/с. Объем электролита 1000 мкл 100 мМ калий-фосфатный буфер, 0,04% тритон X-100, pH 7,4.

**Вставка.** Циклическая вольтамперограмма DDAB/Au/CH3CYP51MT электрода в аэробных условиях до (—) и после (···) прибавления 3,6 мкМ кетоконазола (10 мкл 3,6 мМ). Скорость сканирования 50 мВ/с. Объем электролита 1000 мкл 100 мМ калий-фосфатный буфер, 0,04% тритон X-100, pH 7,4.

Таким образом, предложен метод электрохимической детекции электрокаталитических свойств цитохромов CYP2B4, CYP1A2 и CYP51MT с помощью прямого электрохимического восстановления гемопroteинов, иммобилизованных на наноструктурированных печатных электродах. Преимущество использования мембраноподобных мезопористых подложек, содержащих наночастицы металлов, состоит в том, что такой тип электродов отличается стабильностью, высокой чувствительностью к электроактивным компонентам (в данном случае, к цитохромам CYP2B4, CYP1A2 и CYP51MT), возможностью регистрации электрокатализа как по отношению к кислороду, так к органическим субстратам и (или) ингибиторам.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 04-04-48039), Федерального Агенства по науке и инновациям Министерства образования и науки РФ (№ 02.434.11.7015), Межведомственной программы “Протеомика в медицине и биотехнологии”.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ivanov Yu.D., Govorun V.M., Bykov V.A., Archakov A.I.* (2006) *Proteomics*, **6**, 1399-1414.
2. *Archakov A.I., Bachmanova G.I.* (1990) *Cytochrome P450 and Active Oxygen*, Taylor and Francis Eds., London.
3. *Lewis D.F.V.* (2001) *Guide to Cytochrome P450. Structure and function*. Taylor and Francis Eds., London and New York.
4. *Балакин К.В., Иваненков Я.А.* (2005) *Биомед. химия*, **51**, 384-412.
5. *Cirspi C.L.* (1999) *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.*, **2**(1), 15-19.
6. *Estabrook R.W., Faulkner K.M., Shet M.S., Fisher C.W.* (1996) *Methods Enzymol.*, **272**(B), 44-51.
7. *Bistolas N., Wollenberger U., Jung C., Scheller F.W.* (2005) *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 2408-2423.
8. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Archakov A.I.* (2005) *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1051-1063.
9. *Udit A.K., Gray H.B.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 470-476.
10. *Lisitsa A.V., Gusev S.A., Karusina I.I., Archakov A.I., Koymans L.* (2001) *SAR QSAR Environ. Res.*, **12**(4), 359-366.
11. *Bellamine A., Mangla A.T., Nes W.D., Waterman M.R.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8937-8947.
12. *Turpeinen M., Uusitalo J., Jalonen J., Pelkonen O.* (2005) *Eur. J. Pharm. Sci.*, **24**, 123-132.
13. *Sakai-Kato K., Kato M., Homma H., Toyo'oka T., Utsunomiya-Tate N.* (2005) *Anal. Chem.*, **77**, 7080-7083.
14. *Kumar R.A., Clark D.S.* (2006) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10**, 162-168.
15. *Kulys J., D'Costa E.J.* (1991) *Biosens. Bioelectron.*, **6**, 109-115.
16. *Karyakin A.A., Puganova E.A., Budashov I. A., Kurochkin I.N., Karyakina E.E., Levchenko V.A., Matveyenko V.N., Varfolomeev S.D.* (2004) *Anal. Chem.*, **76**, 474-478.
17. *Rusling J.F., Nassar A.-E.F.* (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 11891-11897.
18. *Rusling J.F.* (1998) *Acc. Chem. Res.*, **31**, 363-369.
19. *Onuoha A.C., Rusling J.F.* (1995) *Langmuir*, **11**, 3296-3301.
20. *Guto P.M., Rusling J.F.* (2006) *Electrochem. Commun.*, **8**, 455-459.
21. *Chen X., Hu N., Zeng Y., Rusling J.F., Yang J.* (1999) *Langmuir*, **15**, 7022-7030.
22. *Tang J., Wang B., Wu Z., Han X., Dong S., Wang E.* (2003) *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 867-872.
23. *Zhang Z., Nassar A.-E.F., Lu Z., Schenkman J.B., Rusling J.F.* (1997) *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **93**, 1769-1774.
24. *Fleming B.D., Tian Y., Bell S.G., Wong L.-L., Urlacher V., Hill A.O.* (2003) *Eur. J. Biochem.*, **270**, 4082-4088.
25. *Udit A.K., Hindoyan N., Hill M.G., Arnold F.H., Gray H.B.* (2005) *J. Inorg. Chem.*, **44**, 41109-41111.
26. *Shukla A., Gillam E., Mitchell D.J., Berhardt P.* (2005) *Electrochem. Commun.*, **7**, 437-442.
27. *Jonson D.L., Lewis B.C., Elliot D.J., Miners J.O., Martin L.L.* (2005) *Biochem. Pharmacol.*, **69**, 1533-1541.
28. *Berthell D., Brust M., Schiffrin D.J., Kiely C.* (1996) *J. Electroanal. Chem.*, **409**, 137-143.
29. *Han X., Cheng W., Zhang Z., Dong S., Wang E.* (2002) *Biochem. Biophys. Acta*, **1556**, 273-277.
30. *Karuzina I.I., Zgoda V.G., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Archakov A.I.* (1999) *Free Rad. Biol. Med.*, **26**, 620-632.
31. *Omura T., Sato R.* (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2379-2385.

32. Imai Y., Hashimoto C., Satake H., Girardin A., Sato R. (1980) *J. Biochem.*, **88**, 489-503.
33. Hashimoto C., Imai Y. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 821-827.
34. Шавкунов А.С., Лазарев В.Н., Згода В.Г., Говорун В.М., Леви П., Янссен П., Арчаков А.И. (2003) *Биомед. химия*, **49**, 145-152.
35. Correa dos Santos M.M., Paes de Sousa P.M., Simoes Goncalves M.L., Krippahl L., Moura J.J.G., Lojou E., Bianco P. (2003) *J. Electroanal. Chem.*, **541**, 153-162.
36. Trkova L., Kizek R., Vacek J. (2004) *Bioelectrochemistry*, **63**, 31-36.
37. Jenkins A.T.A., Dash H-A., Boundy S., Haliwell C.M., French-Constant R.H. (2005) *Bioelectrochemistry*, **68**, 67-71.
38. Shumyantseva V.V., Ivanov Yu.D., Bistolas N., Scheller F.W., Archakov A.I., Wollenberger U. (2004) *Anal. Chem.*, **76**, 6046-6052.
39. Joseph S., Rusling J.F., Lvov Y.M., Friedberg T., Fuhr U. (2003) *Biochem Pharmacol.*, **65**, 1817-1826.
40. Guengerich F.P., Ballou D.P., Coon M.J. (1975) *J. Biol.Chem.*, **250**, 7405-7414.
41. Lewis D.F.V., Hlavica P. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1460**, 353-374.
42. Riley D.J. (2002) *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **7**(3-4), 186-192.
43. Ribrioux S., Kleymann G., Haase W., Heitmann K., Ostermeier C., Michel H. (1996) *J. Histochem.Cytochem.*, **44**, 207-213.
44. Penn S.G., He L., Natan M.J. (2003) *Current Opinion in Chemical Biology*, **7**, 1-7.
45. Cheng W., Dong S., Wang E. (2002) *Langmuir*, **18**, 9947-9952.
46. Wang J. (2005) *Analyst*, **130**, 421-426.
47. Broun K.R., Fox A.P., Natan M.J. (1996) *J.Am. Chem. Soc.*, **118**, 1154-1157.
48. Shumyantseva V.V., Bavastrello V., Carrara S., Riley D.J., Bulko T.V., Skryabin K.G., Archakov A.I., Nicolini C. (2005) *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 217-222.
49. Iwuoha E.I., Smyth M.R. (2003) *Biosens.Bioelectron.*, **18**, 237-244.
50. Bard A.E., Faulkner L.R. (1980) *Electrochemical Methods. Fundamental and Applications*, John Wiley & Sons, New York.

Поступила: 22. 06. 2006.

#### NANOELECTROCHEMISTRY OF CYTOCHROME P450s: DIRECT ELECTRON TRANSFER AND ELECTROCATALYSIS

V.V. Shumyantseva, T.V. Bulko, Yu.O. Rudakov, G.P. Kuznetsova, N.F. Samenkova, A.V. Lisitsa, I.I. Karuzina, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; fax: (495)245-08-57; e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

The present study demonstrates the direct electron transfer between cytochrome P450 2B4 (CYP2B4), P450 1A2 (CYP1A2), sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51MT) and screen printed graphite electrodes, modified with gold nanoparticles and didodecyldimethylammonium bromide (DDAB). Electrodeposition of heme proteins is possible when 2-200 pmol P450/electrode were adsorbed on the surface of nanostructured electrochemical interfaces. Electron transfer, direct electrochemical reduction and interaction with P450 substrates (oxygen, benzphetamine, lanosterol) and inhibitor ketoconazole were analyzed using cyclic voltammetry (CV), square wave (SWV) or differential pulse (DPV) voltammetry, amperometry.

**Key words:** cytochrome P450 2B4, P450 1A2, sterol 14 $\alpha$ -demethylase from *Mycobacterium tuberculosis* (CYP51MT), lanosterol, ketoconazole, screen printed electrodes, bioelectrochemistry, gold nanoparticles, nanostructured electrodes.