

УДК 612.015.1; 577.15; 543.94

©Коллектив авторов

СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ГЕМОПРОТЕИНОВ И НАНОКОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ

В.В. Шумянцева^{1}, Е.В. Супрун¹, Т.В. Булко¹, О.В. Добрынина², А.И. Арчаков¹*

¹Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10; факс: 8 (499) 245-08-57
эл. почта: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

²Российский государственный медицинский университет Росздрава, 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1;

Достижения в нанобиотехнологии в последние годы позволили сделать большой прогресс в разработке сенсорных систем на основе нанокompозитных материалов. В обзоре рассмотрены собственные и литературные данные по наносенсорным системам на основе функционально-значимых для медицины гемопротеинов. Особое внимание уделено электрохимическим нанобиосенсорам и принципам функционирования сенсорных систем медицинского назначения на их основе.

Ключевые слова: гемопротеины, электрохимические биосенсоры, нанокompозитные материалы, каталаза, пероксидаза, цитохром P450, гемоглобин, миоглобин.

ВВЕДЕНИЕ. Одной из задач инженерной (технической) нанотехнологии является сопряжение наноразмерных биообъектов с измерительными аналитическими устройствами. Получение гибридных бионеорганических нанокompозитных материалов служит “мостом” для такого сопряжения.

Функциональная значимость в организме гемопротеинов высока. Участвуя в различных процессах метаболизма живых существ, гемопротеины играют важную роль в поддержании жизни на земле. Гемоглобин и миоглобин осуществляют транспорт молекул кислорода. Цитохром *c* переносит электроны в митохондриальной дыхательной цепи. Цитохром *c* оксидаза катализирует реакцию терминального окисления в дыхательной цепи с участием молекулярного кислорода; пероксидаза - окисление органических субстратов пероксидом водорода, а каталаза - разложение самой перекиси. Цитохромы P450 участвуют в гидроксилировании органических молекул. Синтез оксида азота из L-аргинина катализирует NO-синтаза (рисунок). С химической точки зрения едва ли не всё это многообразие функций основано на окислительно-восстановительных свойствах железа гема [1]. Редокс-активность каталитического центра гемопротеинов и широкий круг катализируемых ими реакций делают гемопротеины перспективными в создании электрохимических биосенсоров. Конструирование платформ для иммобилизации ферментов и детектирования сигнала вовлекает передовые нанотехнологии и наноматериалы, включая нановолокна [2], углеродные нанотрубки [3-5] модификацию поверхности датчиков наночастицами золота [6-9], пленками полимеров [10-15], различными полимерными мембранами [16-20] и т.д.

* - адресат для переписки

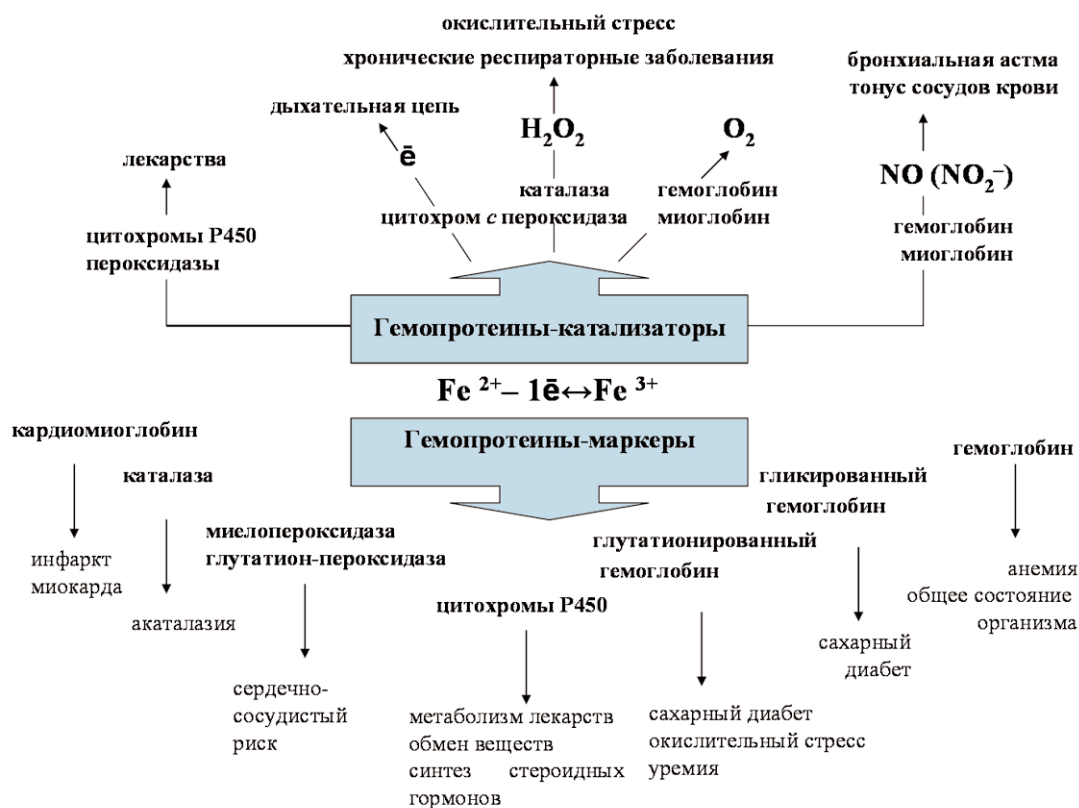


Рисунок.
Клиническая значимость гемопротейнов.

Субстраты и ингибиторы гемопротейнов – биологически активные вещества, относящиеся к различным классам органических и неорганических соединений. Это и лекарственные препараты – субстраты и ингибиторы цитохромов P450 [21-24], и пероксид водорода, увеличение концентрации которого в конденсате выдыхаемого воздуха – признак окислительного стресса [25] и некоторых хронических респираторных заболеваний [26-28]. Определение оксида азота (NO) важно в клинической практике для диагностики астмы [29, 30]. Пероксидазы широко используются в качестве метки антител в иммуноанализе [31-33]. Некоторые нетоксичные субстраты пероксидаз являются перспективными пролекарствами, превращаясь в результате биокаталитической реакции в активные радикалы, токсичные, например, для раковых клеток [34].

Уровень самих гемопротейнов в органах, тканях и биологических жидкостях – важный показатель нормального функционирования организма в целом, что делает перспективным создание различных тест-систем для экспресс-определения белков. Например, анализ крови на гемоглобин уже стал рутинным в медицинской практике. Модифицированные гемоглобины - глутатион-гемоглобин, гликированный гемоглобин - являются маркерами заболеваний [35]. А миоглобин сердечной мышцы является наиболее быстро появляющимся в крови маркером инфаркта миокарда из всех практически используемых в диагностике [36]. Наследственное заболевание, выраженное отсутствием каталазы в крови и тканях человека, получило название акаталазии [37].

Ключевую роль в биотрансформации лекарственных препаратов играют цитохромы P450, работающие в составе микросомальной монооксигеназной системы. Персональный профиль цитохромов P450 определяет индивидуальные особенности метаболизма ксенобиотиков. Определение уровня и каталитической активности различных форм цитохромов P450 в тканях требует проведения фармакокинетических исследований или масс-спектрометрического анализа образцов [38]. Предложенные подходы позволяют выявить нарушения обмена веществ, вызванные целым рядом заболеваний и учесть индивидуальные особенности организма при выборе лекарственных средств. Разработка тест систем для быстрого и точного определения активности той или иной изоформы цитохрома P450 – путь к персонифицированной медицине [39].

1. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЕМОПРОТЕИНОВ. ГЕМ – ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ГЕМОПРОТЕИНОВ.

С точки зрения электрохимии “визитной карточкой” гемопротеинов является способность к прямому переносу электрона с иона железа гема на поверхность электрода, то есть появление на вольтамперограмме пары пиков, соответствующих процессам восстановления и окисления. Электродная реакция гема может быть описана уравнением (1.1):



Редокс активность железа гема служит своего рода электрохимическим маркером гемопротеинов и даёт возможность как их непосредственного определения, так и регистрации воздействия извне на активный центр фермента. Процесс переноса электрона квазиобратим и его эффективность (параметры k_s , E° и ΔE) определяется главным образом матрицей для иммобилизации и материалом электрода. В качестве такой матрицы могут выступать различные нанокompозиты: полимерные пленки, углеродные нанотрубки, алюмосиликаты, ПАВы, ионные жидкости, наночастицы металлов [40-44].

Как следует из уравнения (1.1), потенциалы катодного и анодного пиков пары Fe(II)/Fe(III) фермента зависит от pH раствора. При увеличении pH наблюдается линейный сдвиг формального потенциала системы в область отрицательных значений. Наклон зависимости близок к теоретической величине -58 мВ/pH при 20°C для обратимого одноэлектронного переноса с участием протона [7, 8, 40, 45].

Гемин, содержащий железо Fe(III) , может служить электрохимической моделью гемопротеинов. Иммобилизованный на поверхность рабочего электрода, он проявляет все свойства, присущие окислительно-восстановительной паре Fe(II)/Fe(III) . Например, при встраивании Fe(III) протопорфирина IX в матрицу из углеродных нанотрубок и Нафиона на поверхности графитового электрода на циклических вольтамперограммах наблюдали характерный квазиобратимый одноэлектронный перенос ($E^\circ = -500$ мВ, $\Delta E = 35$ мВ, $k_s = 11 \text{ с}^{-1}$, $E^\circ/\text{pH} = -57,7$ мВ) [46]. В электрохимических сенсорах гемин (или комплекс порфирина с ионом железа) проявляет каталитическую активность по отношению к типичным субстратам гемопротеинов - пероксиду водорода, нитрит-иону [46] или кислороду [47], а также к другим молекулам и ионам: бромату, хлорату и йодат-анионам [48], трихлоруксусной кислоте [49]. Искусственно полученные порфирины с различными заместителями используются как основа для газовых сенсоров (например, на NO_2 [50]) и для моделирования активности биологических систем. Например, гликированный порфирин и его комплекс с ионом железа был использован в качестве распознающего элемента в электрохимическом наносенсоре (при модификации электрода золотыми наночастицами) на артемисинин – эффективный противомаларийный препарат [51] или диклофенак – противовоспалительный, болеутоляющий и жаропонижающий препарат [52].

Однако, изменение природной степени окисления железа гема, а также отсутствие белковой распознающей части, делают гемин или его синтетические аналоги менее специфичными по отношению к субстратам. Очевидно, что при

замене природного фермента на его искусственный аналог – гемин, происходит потеря селективности сенсора только к одной группе или классу соединений.

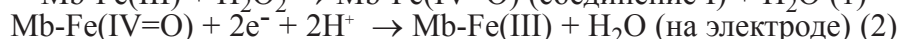
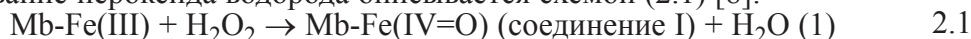
2. СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ГЕМОПРОТЕИНОВ.

2.1. H_2O_2 -сенсоры.

Цель создания подавляющего большинства сенсоров на основе гемопротеинов – регистрация пероксида водорода. H_2O_2 -сенсор выступает в качестве универсального средства измерения скорости соответствующих реакций, в том числе в таких массовых видах анализа, как определение глюкозы, молочной и мочевой кислот. Пероксидазная реакция является основой детектируемого сигнала в иммуноферментном анализе. Пероксидаза включается в состав антител или в конъюгат с антигеном, а характерное изменение активности пероксидазы в результате иммунной реакции является мерой содержания иммуноглобулинов или антигена в пробе. Например, были предложены электрохимические иммуносенсоры на основе модифицированных золотыми наночастицами графитовых электродов для определения специфического биомаркера рака простаты [32] или иммуносенсор на углеводный антиген 19-9 (carbohydrate antigen 19-9), серологический маркер карциномы простаты [33].

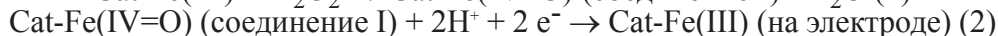
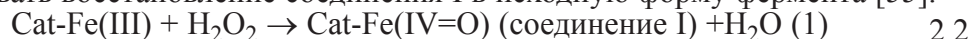
Окислительный стресс – деградиционный процесс с участием свободных радикалов, атакующих ненасыщенные жирные кислоты клеточных органелл. В результате образуются гидропероксиды жирных кислот, которые распадаются на множество вторичных карбонильных продуктов окисления, главный из которых – малоновый альдегид. Одним из индикаторов окислительного стресса является повышенная концентрация пероксида водорода в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ). Пероксид водорода продуцируется воспалительными клетками (эозинофилами, нейтрофилами и макрофагами). Избыток H_2O_2 оказывает цитотоксическое действие на бронхиальный эпителий, способствует высвобождению медиаторов воспаления и развитию гиперреактивности бронхов. Концентрация H_2O_2 в КВВ у курильщиков в 5 раз выше по сравнению с некурящими. Также наблюдается увеличение концентрации пероксида водорода в КВВ у больных с бронхиальной астмой, хронической обструктивной болезнью легких и другими легочными заболеваниями, которые характеризуются хроническим воспалением. Окислительный стресс сопровождается старением и раком [53, 54].

Для определения концентрации пероксида водорода предложено множество разнообразных биосенсоров на основе гемопротеинов. Гемоглобин и миоглобин способны восстанавливать пероксид водорода за счет перехода $Fe(II)$ гема фермента в $Fe(III)$ -состояние. На примере миоглобина электрокаталитическое детектирование пероксида водорода описывается схемой (2.1) [8]:

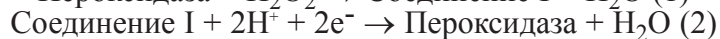


При возрастании концентрации пероксида водорода возрастает ток, соответствующий восстановительному пику.

В организме каталаза разлагает образующийся в процессе биологического окисления пероксида водорода на воду и молекулярный кислород. На электроде можно смоделировать восстановление соединения I в исходную форму фермента [55].



Каталитический цикл пероксидаз начинается с быстрого взаимодействия фермента и H_2O_2 с образованием так называемого соединения I, которое содержит 2 окислительных эквивалента: оксиферрил-гем и свободный радикал (уравнение 2.3 (1)).



Далее в естественных условиях соединение I ($Fe(IV=O, P^{\cdot+})$) (P – порфирин) восстанавливается донором электронов (вторым субстратом) с образованием соединения II ($Fe(IV=O)$), а затем и нативного фермента (уравнение 2.3(2)). [56-58].

В электрокаталитическом цикле пероксидазы, иммобилизованной на электроде, восстановление соединения I в исходное состояние протекает за счет наложения потенциала и, возможно, также через образование соединения II.

Подобно другим гемопротеинам, ион железа гема цитохрома *c* способен обратимо восстанавливаться и окисляться на поверхности электрода под действием поляризации. Цитохром *c* проявляет электрокаталитические свойства по отношению к пероксиду водорода, восстанавливая пероксид [59] и также служит сенсорным элементом датчика на пероксид водорода.

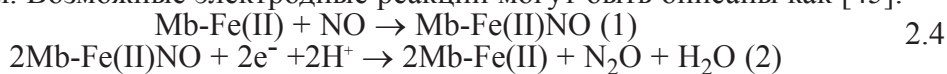
С целью повышения чувствительности датчиков на основе гемопротеинов активно развиваются методы включения белков-ферментов в различные нанокompозитные материалы на поверхности электродов, в том числе с использованием наночастиц металлов, углеродных нанотрубок, допированных наночастицами металлов, ионных жидкостей (расплавы органических солей, находящихся в жидком состоянии в широком интервале температур, в ряде случаев ниже комнатной) [60-63]. Пределы обнаружения H_2O_2 сенсоров на основе гемопротеинов лежат в диапазоне 10^{-6} - 10^{-9} М [64-70].

2.2. NO (NO_2^-) – сенсоры.

С конца 80-х годов 20-го века, когда была открыта роль оксида азота (NO) как фактора релаксации эндотелия (EDRF), он стал объектом активных исследований ученых. NO выполняет много важных функций в регуляции процессов *in vivo*. NO выступает как второй посредник в клеточных сигнальных путях и участвует в транскрипции и трансляции генов. Определение содержания оксида азота в КВВ – важный показатель активности воспалительного процесса и тяжести течения бронхиальной астмы, хронической обструктивной болезни легких и других легочных заболеваний [29, 71-73]. Дисфункция эндотелия является обязательным компонентом практически всех сердечно-сосудистых заболеваний, включая атеросклероз, гипертонию, ишемическую болезнь сердца (ИБС), хроническую сердечную недостаточность (ХСН). NO также участвует в воспалительных реакциях, аутоиммунных процессах, диабете, тромбозе, сепсисе, росте злокачественных опухолей и др. Содержание оксида азота в крови и КВВ является важным показателем здоровья организма.

Основываясь на природной способности железа гема миоглобина и гемоглобина образовывать комплекс с молекулами NO, был предложен ряд электрохимических биосенсоров для определения этой молекулы.

В присутствии NO на характерной для миоглобина циклической вольтамперограмме помимо пары катодного и анодного пиков, относящихся к переносу электрона гема при потенциале около -800 мВ появляется новый катодный пик. Этот пик можно отнести к восстановлению NO, которое облегчается миоглобином. Возможные электродные реакции могут быть описаны как [45]:

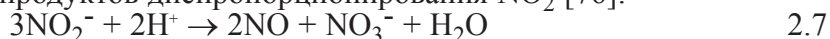


Электрокаталитическое восстановление NO гемоглобином характеризуется резким усилением катодного пика редокс пары Fe(II)/Fe(III) и смещением его потенциала в положительную область. Это позволило создать также и потенциометрический NO-сенсор с очень низким пределом обнаружения – до 20 пМ [74].

Биологическая активность нитрит-аниона уже более века является объектом научных исследований. Совместно с другими органическими и неорганическими нитритами, нитратами и нитро-соединениями, NO_2^- обладает сосудорасширяющим действием. Нитрит также привлекает внимание токсикологов, т.к. способен окислять железо гема гемоглобина или превращаться в кишечнике при определенных условиях в нитрозосоединения, например, в нитрозамин, представляющий угрозу для здоровья человека. Нитрит-анион является маркером активности NO-синтазы, продуктом превращения NO в водных оксигенированных средах. Деактивация нитрита в нитрат происходит через оксигемоглобин и сопровождается формированием метгемоглобина [75]:



Механизм электрокаталитического восстановления NO_2^- миоглобином (или гемоглобином), когда на вольтамперограмме наблюдается появление пика при $E = -770$ мВ может сводиться к восстановлению NO (Епик = -800 мВ для NO [50]) – одному из продуктов диспропорционирования NO_2^- [76]:



Таким образом, гемоглобин и миоглобин являются биораспознающими элементами при создании электрохимических сенсоров для определения нитрит-иона. Особенность таких электрохимических сенсоров - использование наноструктурированных электродов. В качестве нанокомпозитов использовали углеродные нанотрубки, алюмосиликаты. Предел чувствительности определения NO составляет 2×10^{-11} М (для электродов, модифицированных наночастицами алюмосиликатов с иммобилизованным гемоглобином) [77].

2.3. Анализ лекарственных препаратов.

2.3.1. Пероксидаза хрена.

Круг органических субстратов пероксидазы хрена очень велик. Это фенолы, ароматические амины, тиолы, галогенид ионы, тиоцианат ионы, жирные кислоты и т.д. Предложен амперометрический сенсор на основе пероксидазы для определения биогенных аминов - нейромедиаторов, осуществляющих передачу нервного импульса: адреналина, норадреналина, дофамина, серотонина [78]. В клинической практике норадреналин и дофамин используются для поддержания артериального давления [79]. Исследователи связывают дофамин с болезнью Паркинсона, а адреналин и норадреналин – с возникновением опухолей [78]. Пероксидазный сенсор использовали и для определения ряда лекарственных препаратов - рифампицина (препарат противотуберкулезного действия) [80] и клозапина – нейролептика, применяемого для лечения шизофрении [81]. В обоих случаях сигналом биосенсора служил ток восстановления окисленной формы препарата. Чувствительность сенсоров на основе наноструктурированных электродов и пероксидазы хрена довольно высока. Например, амперометрический сенсор для определения серотонина имеет предел обнаружения 17 нг/мл (10^{-7} М) [78], а сенсор для определения рифампицина - $5,06 \times 10^{-6}$ М [80].

2.3.2. Цитохромы P450.

При проведении исследований по поиску новых лекарственных препаратов, их токсичности, лекарственной интерференции наиболее значимыми ферментами являются цитохромы P450. Клиническая значимость цитохромов P450 связана с их функциями в метаболизме экзогенных и эндогенных соединений. 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, витамин D, ретиноиды, желчные кислоты, простагландины и др.) [82, 83]. Метаболизм чужеродных соединений, катализируемый цитохромами P450, приводит к образованию токсичных метаболитов, влияющих на генетические процессы и канцерогенез [84]. Прогнозирование метаболических превращений физиологически активных соединений и исследование потенциальных путей метаболизма проводится как с помощью компьютерных методов [85-87], так и экспериментальным путём с помощью ферментных систем организма *in vitro* [84, 88]. Для исследования активности цитохромов P450, высокопроизводительного скрининга потенциальных субстратов и ингибиторов этого надсемейства гемопротеинов, как потенциальных биокатализаторов в последние годы получили развитие различные подходы, основанные на использовании рекомбинантных и генетически модифицированных ферментов [89] в сочетании с нанотехнологическими подходами [90, 91].

Эндогенными субстратами цитохромов P450 являются насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, эйкозаноиды [92], стероидные гормоны [93-98], витамин D, витамин E [99], ретиноиды, желчные кислоты, простагландины, уропорфириногены, арахидоновая кислота [100, 101]. Экзогенные субстраты цитохромов P450 человека - это лекарственные препараты, вещества, попадающие из окружающей среды (пестициды, гербициды), растительные компоненты. В метаболизм ксенобиотиков включены семейства человеческих цитохромов CYP1, CYP2, CYP3, и в меньшей степени, CYP4. Например, P450 1A2 метаболизирует 106 субстратов, из которых 72 вещества являются лекарственными препаратами (кофеин, парацетамол, фенацетин) [102]. Пять основных форм цитохромов из 40 человеческих цитохромов P450 ответственны за метаболизм более чем 87% лекарственных препаратов: CYP3A4, CYP2D6, CYP1F2, CYP2C9, CYP2C19 [103].

Ингибиторы цитохромов P450 могут быть потенциальными лекарственными препаратами, влияя на 1) тот или иной метаболический путь, и 2) снижая активность той или иной формы гемопroteина, ответственной за метаболизм лекарственных препаратов. Цитохромы P450 являются также объектами-мишенями при разработке новых противораковых препаратов в случае гормонозависимых онкологических заболеваний [104]. Потенциальные ингибиторы CYP19 (ароматазы) используются при лечении рака молочной железы как эстроген-зависимого онкопоражения. Ингибиторы CYP17 (17- α -гидроксилазы) используются при лечении андроген-зависимого рака простаты [105, 106].

Роль цитохромов P450 в метаболизме лекарственных соединений неоднозначна. Цитохромы P450 гидроксилируют лекарства, делая их более гидрофильными и способствуя выведению их из организма. Кроме того, метаболиты лекарственных соединений могут быть в свою очередь ещё более эффективными лекарственными веществами. Например, конверсия антигистаминного препарата лоратадина в дескарбэтоксилоратадин с помощью CYP2D6 и CYP3A4 необходима для проявления фармакологической активности этого препарата [107]. С другой стороны, метаболизм лекарственных препаратов часто ведет к нежелательным биологическим последствиям. Так, анальгетик ацетаминофен окисляется цитохромами P450 в N-ацетил-*n*-бензохинонимин, который является гепатотоксичным веществом и является главным "виновником" заболеваний печени при приеме ацетаминофена [108-110].

Разработаны технологии для высокопроизводительного скрининга ингибиторов цитохромов P450 на стадии раннего исследования доступных химических соединений, т.е. соединений с "полки" (off-the-shelf). Разработка лекарств - многопараметрический процесс, связанный с оптимизацией взаимодействия кандидатных химических веществ с мишенью и поиском условий для снижения побочных взаимодействий. Кроме того, потенциальные лекарственные вещества исследуются по многим параметрам, таким как абсорбция, распределение, метаболизм, выведение и токсичность (тест ADME-Tox).

Цитохромы P450 вовлечены в метаболизм более чем 60% всех применяемых лекарственных препаратов. В связи с функциональной и клинической значимостью цитохромов P450 активно развиваются методы и системы для моделирования метаболизма человека в различных форматах: с использованием изолированных срезов печени, первичных гепатоцитов, клеточных линий культивированной гепатомы человека (например, HepG2, Hep3B, HepBC2) [107, 110]. Изолированные срезы печени и выделенные из них микросомы использовались для исследования индукции экспрессии генов цитохромов P450 при инкубации с лекарственными препаратами: карбамазепином, клотримазолом, дексаметазоном, гиперфолином, ловастатином, омепразолом, фенobarбиталом, фенитоином, примакином, рифампицином, TCDD, троглитазоном. После введения коктейля маркерных субстратов (фенацетин, диклофенак, мидазолам) проводился LC/MS анализ активности по регистрации метаболитов: парацетамол (CYP1A2), 4-ОН-диклофенак (CYP2C9), и 1-ОН-мидазолам (CYP3A) [111].

Однако аналитические системы на основе клеточного и тканевого материала имеют ряд существенных ограничений. Биологический материал (изолированные срезы печени) трудно доступен для анализов, быстро теряет активность. Клеточные линии могут обладать активностью, различающейся для разных опытов, и имеют ограниченный период использования. Кроме того, культивированные гепатоциты и клетки гепатомы имеют низкий уровень экспрессии изоформ P450 в отсутствие специфических индукторов.

Наиболее подходящими для исследования P450-зависимого метаболизма являются микросомальные или рекомбинантные цитохромы P450, бакулосомы (клетки насекомых, трансфицированные бакуловирусом и экспрессирующие различные цитохромы P450), микросомы печени человека [112, 113].

Для исследования цитотоксических свойств метаболитов, генерируемых цитохромами P450 при гидроксировании лекарственных препаратов, были разработаны системы на основе бакулосом (MetaChip) для высокопроизводительного анализа токсичности [107]. Бакулосомы были включены в золь-гель полисилоксановые матрицы на стеклянной подложке, диаметр пятен составлял 0,6 мм с 60 нл объемом исследованных соединений. Авторы сравнивали соотношения V_{max}/K_m для фермента (CYP3A4) в растворе и при включении в золь-гель матрицу. Активность инкапсулированного фермента составляла 1/3 от его активности в растворе. Для исследования токсичности метаболитов после проведения ферментативной реакции стекло с инкапсулированными ферментами соединяли со стеклом с MCF5 клетками. Это обеспечивает тесный контакт клеток и метаболитов. Цитотоксичность оценивали по флуоресценции. Продуктивность такого анализа 15×35 точек на одной стеклянной пластине.

Для исследования новых химических соединений в качестве субстратов цитохромов P450 разработан подход, основанный на анализе уровня метаболитов смеси хорошо известных субстратов (“коктейля” из лекарственных препаратов) без ингибиторов и в присутствии ингибиторов. Такой подход получил название “cocktail” или “N-in-1 assay” [103, 111, 112]. Исследовались микросомы печени человека и бакулосомы с экспрессированными человеческими цитохромами CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 3A5. Были выбраны следующие субстраты с известными кинетическими параметрами и известными метаболитами: мелатонин (CYP1A2), кумарин (CYP2A6), бупропион (CYP2B6), амодиаксин (CYP2C8), толбутамид (CYP2C9), омепразол (CYP2C19 и CYP3A4), декстрометорфан (CYP2D6), хлорзоксозон (CYP2E1), мидазолам (CYP3A4), тестостерон (CYP3A4). Анализ метаболитов проводили методом LC/TOF-MS. “N-in-1” подход сопоставим с исследованием по обычной схеме с одним субстратом и позволяет исследовать новые химические соединения с позиций лекарственной интерференции, а также субстратных и (или) ингибиторных параметров [112, 113].

Для автоматизации и использования инструментальных методов разработаны различные технологии с целью высокопроизводительного поиска среди доступных химических соединений и среди новых химических веществ потенциальных субстратов и ингибиторов цитохромов P450. Особенностью таких технологий является использование роботов для раскапывания образцов, использование планшетных камер для образцов, использование многоканального анализа, использование сканирующих риддеров для планшетных анализаторов, использование tandemного HPLC и масс-спектрометрического анализа (LC/MS/MS) [114-116].

Анализ активности цитохромов P450 проводится различными методами.

Метод с использованием радиоактивных субстратов [117, 118] основан на использовании 3H - или ^{14}C - меченых субстратов, избирательно окисляемых соответствующей формой цитохромов P450. Метаболит отделяется с помощью жидкостной хроматографии и количественно определяется по радиоактивной метке. Например, ^{14}C -формальдегид, образующийся при деметилировании, экстрагируется и детектируется по радиолуминесценции. Источником

цитохромов P450 служат микросомы печени или рекомбинантные белки. Производительность анализа высокая, но развитие метода ограничено наличием меченых химических соединений.

В методе с использованием флуорогенных субстратов [118, 119], как правило, флуоресценцией обладает продукт ферментативной реакции. Мониторинг с помощью флуоресцентных риддеров дает информацию об изменении флуоресценции в присутствии других субстратов или ингибиторов. Источником цитохромов P450 являются рекомбинантные формы. Для анализа используются 96-луночные планшеты. В качестве флуорогенных субстратов используют алкоксирезорифины, дибензилфлуоресцеин, замещенные кумарины. Коммерческий источник высокочувствительных флуорогенных субстратов представлен в Интернете на сайте: <http://gcms.invitrogen.com/downloads/vivid.pdf>. Флуоресцентный анализ часто используется для предварительной оценки свойств химических соединений.

БиOLUMИнесцентный метод [118, 120] основан на использовании субстратов, которые образуют люциферин в качестве метаболита. Этот метод коммерциализирован фирмой Promega (http://www.promega.com/cnotes/cn010_06.htm). Анализ проводят в присутствии люциферазы и АТФ. При этом люциферин превращается в дез-карбоксилюциферин. При этом происходит эмиссия света, регистрируемая с помощью люминометра. Анализ также проводят с использованием 96-луночных планшет. Источником цитохромов P450 являются рекомбинантные формы. Ограничение метода - соединения, взаимодействующие с люциферазой и обладающие собственной люминесценцией [118].

Все перечисленные методы обладают высокой чувствительностью (до 10^{-7} М), но не позволяют различать субстраты и ингибиторы при проведении анализа: требуется присутствие известного субстрата с радиоактивной или флуоресцентной меткой [118].

Хромато-масс-спектрометрический анализ (LC/MS) обладает высокой чувствительностью, не требует специальных оптических свойств для метаболитов, позволяет проводить анализ в объединенном формате, т.е. объединить все исследуемые образцы [86, 121].

Электрохимические подходы перспективны для исследования фермент-субстратных взаимодействий вследствие высокой чувствительности [9, 122-124]. Особенностью электрохимических сенсоров на основе цитохромов P450 является использование наноструктурированных электродов для повышения чувствительности анализа.

Электрохимический биосенсор на основе CYP2B4 был предложен для определения фенобарбитала (достигнутый предел определения $0,289 \times 10^{-6}$ М), который является субстратом цитохрома P450 [125].

Попытки разработать потенциометрический анализ фермент-субстратного взаимодействия оказались малоэффективными, так как между смещением восстановительного потенциала без субстрата и в присутствии субстрата не наблюдается прямой корреляции. Кроме того, такой подход не эффективен при поиске ингибиторов цитохромов P450.

Для разработки алгоритма поиска потенциальных субстратов и ингибиторов цитохромов P450 нами были исследованы различные электрохимические методы. Наноструктурированные золотыми наночастицами электроды с иммобилизованными цитохромами P450 2B4, 1A2, 3A4, 11A1 (P450_{scc}), P450 51b1 (CYP51) были исследованы в присутствии субстратов и (или) ингибиторов этих форм [126].

Для исследования электроаналитических характеристик использовали вольтамперные отклики электродов, регистрируемые с помощью цикловольтамперометрии и вольтамперометрического анализа (квадратно-волновой и дифференциальной импульсной вольтамперометрии). Субстраты соответствующих форм цитохромов P450 вызывают существенное повышение каталитического тока при контролируемом напряжении, а ингибиторы не изменяют или снижают максимальные амплитуды токов [127].

Для исследования ряда ферментов и (или) нескольких субстратов были использованы 96-канальные планшетные электрохимические ридеры (фирма Alderonbiosciences, <http://www.alderonbiosciences.com>). Необходимо отметить, что при исследовании по классической схеме методом квадратно-волновой вольтамперометрии, или с помощью многоканального микропотенциостата, получены близкие значения изменения токов. Регистрируется возрастание каталитического тока в присутствии субстратов соответствующих форм цитохромов P450, ингибирование тока при добавлении ингибитора и ингибирование каталитического тока в случае первоначально добавленного ингибитора, а затем субстрата.

Таким образом, по результатам амперометрии, циклической вольтамперометрии, вольтамперометрического анализа (дифференциальной импульсной вольтамперометрии (DPV) и квадратно-волновой вольтамперометрии (SWV) и периодически-импульсной амперометрии можно проводить поиск и исследовать кинетические параметры потенциальных субстратов и ингибиторов цитохромов P450. Предложенный электрохимический подход - своего рода штрих-код для определения субстратного и ингибиторного потенциала цитохромов P450.

Электрохимические методы могут быть сопряжены с хромато-масс-спектрометрическим анализом. Анализ продуктов электрохимической реакции с помощью LC/MS показал наличие тех же веществ, что и в случае ферментативной реакции в присутствии кофакторов и белков-партнеров [126, 128].

Использование электрохимических методов в сочетании с нанотехнологиями позволяет миниатюризировать электроды и измерительные устройства для потенциального применения в качестве "лаборатории на чипе" (laboratory-on-a-chip type devices) [90, 129, 130], микрочипов и профилактических биосенсоров (point-of-care biosensors)[131].

Дальнейшее развитие методов высокопроизводительного поиска потенциальных субстратов и ингибиторов цитохромов P450 связано с миниатюризацией и автоматизацией процессов, уменьшению расхода реагентов, времени анализа, стадий анализа, что в свою очередь, ведет к снижению стоимости исследования.

3. СЕНСОРЫ НА ГЕМОПРОТЕИНЫ.

3.1. Миоглобин и пероксидаза как кардиомаркеры.

Роль сердечного миоглобина человека возможно гораздо шире, чем просто узнавание, перенос и сохранение молекулярного кислорода в мышечной ткани. Миоглобин может выступать в роли инактиватора или переносчика оксида азота (NO), проявлять пероксидазную активность для устранения перекисных соединений (ROOH) или вызывать аллостерический эффект, когда связывание лиганда с одним участком белка облегчает связывание другого лиганда (NO, O₂, CO) с активным центром – гемом [132].

Миоглобин является наиболее быстро появляющимся белком-маркером инфаркта миокарда (ИМ) из всех практически используемых в диагностике (сердечные изоформы тропонинов I и T или креатинкиназа). При повреждении сердечной мышцы происходит высвобождение биомолекул в кровь. Уровень миоглобина резко повышается уже спустя 1-3 часа после первых симптомов приступа (с пиком в промежутке 8-12 часов), а к 24-му часу он в неизменном виде выводится с мочой из организма [36, 133]. При остром инфаркте миокарда (ОИМ) концентрация миоглобина резко повышается от нормы (женщины 12-76 нг/мл, мужчины 19-92 нг/мл) до 1500 нг/мл (86 нМ) [134-136]. При инфаркте миокарда выраженность гипермиоглобинемии находится в прямой зависимости от размеров очага некроза [137-140]. По уровню миоглобина можно судить об обширности ОИМ. Однако миоглобин не является специфическим кардиомаркером, т.к. содержится также в скелетных мышцах. Пациенты с почечной недостаточностью, ушибами или травмами мышц могут иметь повышенную концентрацию миоглобина в крови и в отсутствии ОИМ [36, 141].

Данные ограничения могут быть преодолены комбинированием измерения миоглобина и одного из специфических маркеров скелетных мышц (карбоангидразы III) либо кардиомаркера (тропонина I) [141]. Важно отметить, что комплексы тропонинов могут быть обнаружены в крови только спустя 16-30 часов после приступа [36, 141]. Еще одним способом решения проблемы является использование подходов иммуноанализа, т.е. антител к кардиоформе миоглобина.

Среди методов определения миоглобина наиболее широко используется иммунохимический подход, реализованный в виде твёрдофазного иммуноферментного анализа, например, с использованием щелочной фосфатазы в качестве ферментативной метки антител [36]. В данной работе поликлональные антитела к кардио миоглобину человека были иммобилизованы на поверхность печатного графитового электрода. Для определения миоглобина сенсор выдерживали в цельной крови 30 мин при 37°C. Измерение сигнала проводили при $E = +300$ мВ (относительно Ag/AgCl) в присутствии 0,25 мг/мл *p*-аминофенил фосфата. Определяемый предел миоглобина составляет 10 нг/мл (0,56 нМ), с калибровочным графиком в диапазоне 85-925 нг/мл, что вполне перекрывает клинически значимые концентрации 80-800 нг/мл (4,48-44,8 нМ).

Для диагностики ОИМ был также предложен электрохимический "сэндвичевый" иммуноанализ миоглобина на основе редокс сигнала золотых наночастиц, которыми были помечены вторичные антитела к миоглобину [132].

Предложенный нами метод прямого электрохимического определения кардио миоглобина обладает высокой чувствительностью (диапазон определяемых концентраций 10 нг/мл - 1780 нг/мл, 0,56 нМ - 100 нМ) и не требует использования вторичных меченых антител [142]. Метод основан на усилении сигнала гемопротейна при использовании электродов, модифицированных коллоидным золотом и на возникновении каталитического тока при взаимодействии миоглобина с кислородом. Специфичность анализа обеспечивается иммобилизацией на электроде антител к кардио миоглобину.

У пациентов с болью в грудной клетке и высоким риском сердечно-сосудистых патологий изменяется уровень и других гемопротейнов – пероксидаз: повышается плазменный уровень миелопероксидазы, а активность глутатион-пероксидазы 1, напротив, снижается. Оба эти фермента обладают признаками "идеального" маркера риска [136, 137].

У 83 исследованных больных с ангиографически подтвержденным диагнозом ИБС за период наблюдения (в среднем 4,7 года) был зарегистрирован ИМ или летальный исход, обусловленный сердечно-сосудистой патологией. Уровень эритроцитарной глутатион-пероксидазы 1 был обратно пропорционально связан с риском будущих сердечно-сосудистых патологий [137]. Средний уровень миелопероксидазы был выше у тех пациентов, у которых в течение 16 ч после госпитализации развился инфаркт миокарда: 320 пМ против 178 пМ у больных без ИМ ($p < 0,001$). Исходное повышение уровня миелопероксидазы ассоциировалось с риском смертности, ИМ, повторного инфаркта, потребности в реваскуляризации в течение ближайших 30 дней или 6 месяцев ($p < 0,001$). Даже при нормальном уровне тропонина Т в течение первых 16 ч после поступления, исходная концентрация миелопероксидазы была выше среди тех больных, у которых в течение ближайших 6 месяцев развивалось то или иное сердечно-сосудистое событие. Согласно данным мультивариационного анализа, концентрация миелопероксидазы являлась независимым предиктором повышения сердечно-сосудистого риска. Определение концентраций миелопероксидазы и тропонина Т предсказывало до 84,5% основных сердечно-сосудистых событий, в то время как оценка одного уровня тропонина Т - лишь 58,0%. Повторные повышения уровня миоглобина в крови на фоне уже начавшейся нормализации говорит об образовании новых очагов некроза. Таким образом, миоглобин – единственный из биохимических и самый ранний из всех маркер повторного инфаркта миокарда. В связи с этим очевидна практическая значимость разработки экспресс-сенсоров для определения уровня кардиомиоглобина в крови [143].

3.2. Гемоглобин.

Анализ крови на гемоглобин – необходимый показатель для диагностики различных заболеваний. Как было показано в предыдущих главах данного обзора, разработано множество схем, позволяющих регистрировать прямой перенос электрона железа гема, т.е. присутствие гемопротеинов на поверхности электрода. Хотя объектами анализа с помощью гемопротеиновых сенсоров чаще всего являются H_2O_2 и NO , подходы иммобилизации ферментов могут быть применены и для разработки электрохимического сенсора непосредственно на гемоглобин. Так, после простого высушивания на поверхности стеклоуглеродного электрода образца крови рыб можно наблюдать появление на вольтамперограмме сигнала гемоглобина [44].

Гликированный гемоглобин является одним из компонентов гемоглобина в эритроцитах человека. Он образуется в неферментативной реакции глюкозы с концевой аминогруппой валина β -цепи этого гемопротеина. Уровень гликированного гемоглобина в крови больных диабетом вследствие переизбытка глюкозы значительно повышен, что помогает проследить долгосрочное развитие болезни без влияния короткосрочных флуктуаций глюкозы крови [35, 144, 145]. Норма гликированного гемоглобина – 4-7% от уровня свободного гемоглобина. В соответствии с рекомендациями Всемирной Организации Здравоохранения анализ на гликированный гемоглобин – самый эффективный и необходимый метод в диагностике сахарного диабета. Больным сахарным диабетом рекомендуется сдавать биохимический анализ крови на гликированный гемоглобин не реже 1 раза в квартал. Глутатион-гемоглобин регистрируется у пациентов с сахарным диабетом и заболеваниями мочевыводящих путей [35].

Предложены электрохимические подходы определения гликированного и общего гемоглобина [146, 147]. Данный подход включает предварительное мечение гликированного гемоглобина в образце производным ферроцена и борной кислоты (за счет реакции борной кислоты с углеводным фрагментом). Общее количество гемоглобина определялось микровзвешиванием с помощью электрохимических кварцевых нановесов, а гликированная часть – электрохимически квадратно-волновой вольтамперометрией по пику ферроцена при $E = +200$ мВ [146]. Электрохимические сенсоры позволяют определять до 20% гликированного гемоглобина (10-90 мкг/мл) от общего гемоглобина (50-2000 мкг/мл) в образцах крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Электронный транспорт является ключевой стадией для каталитического механизма 1060 ферментов, но только для 50 из них удалось показать прямой перенос электронов между электродом и белком [148]. Гемопротеины составляют функционально-важную и представительную группу редокс-активных белков. В данном обзоре проанализированы подходы к созданию электрохимических биосенсоров на основе гемопротеинов для анализа активности самих ферментов, их субстратов и (или) ингибиторов с целью прогнозирования патологических состояний и диагностирования различных заболеваний. Развитие сенсорных систем различных типов позволяет использовать их не только в клинической медицине в формате “lab-on-the-chip” или “bench-top analysers”, но и как профилактические биосенсоры и средства самоконтроля (point-of-care biosensors). Использование нанотехнологий и наноразмерных композитных материалов позволяет конструировать электрохимические нанобиосенсоры [149-151] с высокой чувствительностью, достигающей 10^{-12} - 10^{-18} М [152], широким диапазоном определяемых концентраций и минимальными анализируемыми объемами биологических жидкостей (1-2 мкл).

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального Агентства по науке и инновациям Министерства образования и науки РФ (государственный контракт ФЦП № 02.512.11.2212, № 02.740.11.0306), Совета по грантам Президента РФ (НШ-439.2008.4) и Межведомственной Программы “Протеомика в медицине и биотехнологии”.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shikama K.* (2006) *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **91**, 83-162.
2. *Yang M., Qu F., Li, Y., He Y., Shen G., Yu R.* (2007) *Biosens. Bioelectron.*, **23**, 414-420.
3. *Xiang C., Zou Y., Sun L.-X., Xu F.* (2007) *Talanta*, **74**, 206-211.
4. *Salimi A., Noorbakhsh A., Ghadermarzi M.* (2007) *Sensors and Actuators B: Chemical*, **123**, 530-537.
5. *Zhou H., Lu T.-H., Shi H.-X., Dai Z.-H., Huang X.-H.* (2008) *J. Electroanal. Chem.*, **612**, 173-178.
6. *Tangkuaram T., Ponchio C., Kangkasomboon T., Katikawong P., Veerasai W.* (2007) *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 2071-2078.
7. *Yang G., Yuan R., Chai Y.-Q.* (2008) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **61**, 93-100.
8. *Yang W., Li Y., Bai Y., Sun C.* (2006) *Sensors and Actuators B: Chemical*, **115**, 42-48.
9. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Rudakov Yu.O., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Lisitsa A.V., Karuzina I.I., Archakov A.I.* (2007) *J. Inorg. Biochem.*, **101**, 859-865.
10. *Shen L., Hu N.* (2004) *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, **1608**, 23-33.
11. *Jiang X., Zhang L., Dong S.* (2006) *Electrochem. Commun.*, **8**, 1137-1141.
12. *Zhang L., Jiang X., Niu L., Dong S.* (2006) *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1107-1115.
13. *Varma S., Mattiasson B.* (2005) *J. Biotechnology*, **119**, 172-180.
14. *Kafi A.K.M., Lee D.-Y., Park S.-H., Kwon Y.-S.* (2007) *Thin Solid Films*, **515**, 5179-5183.
15. *Tao W., Pan D., Liu Y., Nie L., Yao S.* (2005) *Anal. Biochem.*, **338**, 332-340.
16. *Nadzhafova O.Yu., Zaitsev V.N., Drozdova M.V., Vaze A., Rusling J.F.* (2004) *Electrochem. Commun.*, **6**, 205-209.
17. *Wu Y., Shen Q., Hu S.* (2006) *Anal. Chim. Acta*, **558**, 179-186.
18. *Zhao G., Feng J.-J., Xu J.-J., Chen H.-Y.* (2005) *Electrochem. Commun.*, **7**, 724-729.
19. *Di J., Zhang M., Yao K., Bi S.* (2006) *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 247-252.
20. *Li M., He P., Zhang Y., Hu N.* (2005) *Biochim. Biophys. Acta - Proteins & Proteomics*, **1749**, 43-51.
21. *Joseph S., Rusling J.F., Lvov Yu.M., Friedberg T., Fuhr U.* (2003) *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 1817-1826.
22. *Hakki T., Bernhardt R.* (2006) *Pharmacol. Therapeutics*, **111**, 27-52.
23. *McLean K.J., Dunford J., Neeli R., Driscoll M.D., Munro A.W.* (2007) *Arch. Biochem. Biophys.*, **464**, 228-240.
24. *Crivori P., Poggesi I.* (2006) *Eur. J. Med. Chem.*, **41**, 795-808.
25. *Olin A.-C., Svensson S., Ljungkvist G., Lärstad M., Slabanja V., Bake B., Torén K.* (2006) *Microchem. J.*, **82**, 17-21.
26. *Anh D. T.V., Olthuis W., Bergveld P.* (2005) *Sensors and Actuators B: Chemical*, **111-112**, 494-499.
27. *Rysz J., Stolarek R.A., Luczynski R., Sarniak A., Włodarczyk A., Kasielski M., Nowak D.* (2007) *Pulmonary Pharmacol. Therapeutics*, **20**, 281-289.
28. *Kwiatkowska S., Szkudlarek U., Luczynska M., Nowak D., Zieba M.* (2007) *Respiratory Medicine*, **101**, 574-580.
29. *Baraldi E., Carraro S.* (2006) *Pediatric Respiratory Reviews*, **7**, S20-S22.
30. *Teague G., Fitzpatrick A., Erzurum S., Hunt J.F.* (2006) *J. Allerg. Clin. Immunol.*, **118**, 817-822.
31. *Lin J., Ju H.* (2005) *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 1461-1470.
32. *Sarkar P., Pal P.S., Ghosh D., Setford S.J., Tothill I.E.* (2002) *Int. J. Pharmaceutics*, **238**, 1-9.
33. *Du D., Xu X., Wang S., Zhang A.* (2007) *Talanta*, **71**, 1257-1262.
34. *Ryan B.J., Carolan N., Fágáin C.Ó'.* (2006) *Trends in Biotechnol.*, **24**, 355-363.

35. *Dalle-Donne I., Scaloni A., Butterfield D.A.* (2006) Redox proteomics, Wiley Interscience, p. 651-667.
36. *O'Regan T.M., O'Riordan L.J., Pravda M., O'Sullivan C.K., Guilbault G.G.* (2002) Anal. Chim. Acta, **460**, 141-150.
37. *Ленахин В.К., Белоусов Ю.Б., Мусеев В.С.* (1988) Клиническая фармакология с международной номенклатурой лекарств. Изд-во Ун-та дружбы народов, Москва.
38. *Petushkova N.A., Lisitsa A.V., Karuzina I.I., Zgoda V.G., Sheremetyeva C.F., Samenkova N.F., Nikitin I.P., Sakharova T.A., Kopylov A.T., Archakov A.I.* (2008) Biochemistry (Moscow) Supplemented Series B: Biomedical Chemistry, **1**, 47-54.
39. *Арчаков А.И., Лисица А.В., Петушкова Н.А., Карузина И.И.* (2008) Клин. мед., **86**, 4-8.
40. *Gao L., Gao Q.* (2007) Biosens. Bioelectron., **22**, 1454-1460.
41. *Wang G., Liu Y., Hu N.* (2007) Electrochim. Acta, **53**, 2071-2079.
42. *Shi C.-G., Xu J.-J., Chen H.-Y.* (2007) J. Electroanal. Chem., **610**, 186-192.
43. *Lu Q., Zhou T., Hu S.* (2007) Biosens. Bioelectron., **22**, 899-904.
44. *Xu Y., Hu C., Hu S.* (2008) Bioelectrochemistry, **72**, 135-140.
45. *Zhao G.-C., Zhang L., Wei X.-W., Yang Z.-S.* (2003) Electrochem. Commun., **5**, 825-829.
46. *Turdean G.L., Popescu I.C., Curulli A., Palleschi G.* (2006) Electrochim. Acta, **51**, 6435-6441.
47. *Ye J.-S., Wen Y., Zhang W.D., Cui H.-F., Gan L.M., Xu G. Q., Sheu F.-S.* (2004) J. Electroanal. Chem., **562**, 241-246.
48. *Salimi A., Mamkhezri H., Hallaj R., Zandi S.* (2007) Electrochim. Acta, **52**, 6097-6105.
49. *De la Rosa A. G., Castro-Quezada E., Gutiérrez-Granados S., Bedioui F., Alatorre-Ordaz A.* (2005) Electrochem. Commun., **7**, 853-856.
50. *Dunbar A.D.F., Richardson T.H., Hutchinson J., Hunter C.A.* (2008) Sensors and Actuators B: Chemical, **128**, 468-481.
51. *Gong F.-C., Xiao Z.-D., Cao Z., Wu D.-X.* (2007) Talanta, **72**, 1453-1457.
52. *Santos E.M.G., Araújo A.N., Couto C.M., Montenegro M.C. B.S.M.* (2006) J. Pharm. Biomed. Anal., **42**, 535-542.
53. *Francesco F.Di., Fuoco R., Trivella M.G., Ceccarini A.* (2005) Microchem. J., **79**, 405-410.
54. *Анаев Э.Х.* (2002) Актуальные вопросы пульмонологии, **2**, 9-11.
55. *Jiang H.-J., Yang H., Akins D.L.* (2008) J. Electroanal. Chem., **623**, 181-186.
56. *Ferapontova E., Castillo J., Hushpulia D., Tishkov V., Chubar T., Gazaryan I., Gorton L.* (2005) Electrochem. Commun., **7**, 1291-1297.
57. *Газарян И.Г., Хушпультян Д.М., Тишков В.И.* (2006) Усп. биол. химии, **46**, 303-322.
58. *Chaubey A., Malhotra B.D.* (2002) Biosens. Bioelectron., **17**, 441-456.
59. *Krylov A.V., Adamzig H., Walter A.D., Luchel B., Kurth E., Pulz O., Szeponik J., Wegerich F., Lisdat F.* (2006) Sensors and Actuators B: Chemical, **119**, 118-126.
60. *Xiang C., Zou Y., Sun L., Xu F.* (2008) Electrochem. Commun., **10**, 38-41.
61. *Wang B., Zhang J.-J., Pan Z.-Y., Tao X.-Q., Wang H.-S.* (2009) Biosens. Bioelectron., **24**, 1141-1145.
62. *Shi L., Liu X., Niu W., Li H., Han S., Chen J., Xu G.* (2009) Biosens. Bioelectron., **24**, 1159-1163.
63. *Liu C.-Y., Hu J.M.* (2009) Biosens. Bioelectron., **24**, 2149-2154.
64. *Wang L., Wang E.* (2004) Electrochem. Commun., **6**, 225-229.
65. *Xu S., Han X.* (2004) Biosens. Bioelectron., **19**, 1117-1120.
66. *Wang G., Xu J.-J., Chen H.-Y., Lu Z.-H.* (2003) Biosens. Bioelectron., **18**, 335-343.
67. *Zhang Y., He P., Hu N.* (2004) Electrochim. Acta, **49**, 1981-1988.
68. *Tangkuaram T., Ponchio C., Kangkasomboon T., Katikawong P., Veerasai W.* (2007) Biosens. Bioelectron., **22**, 2071-2078.

69. Song Y., Wang L., Ren C., Zhu G., Li Z. (2006) *Sensors and Actuators B: Chemical*, **114**, 1001-1006.
70. Salimi A., Sharifi E., Noorbakhsh A., Soltanian S. (2007) *Biophys. Chem.*, **125**, 540-548.
71. Olin A.-C., Andelid K., Vikgren J., Rosengren A., Larsson S., Bake B., Ekberg-Jansson A. (2006) *Respiratory Medicine*, **100**, 1013-1019.
72. Montuschi P. (2005) *Clin. Chim. Acta*, **356**, 22-34.
73. Беленков Ю.Н., Мареєв В.Ю., Агєєв Ф.Т. (2001) Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента в лечении сердечно-сосудистых заболеваний (Квиноприл и эндотелиальная дисфункция), Наука, Москва.
74. Fan C., Liu X., Pang J., Li G., Scheer H. (2004) *Anal. Chim. Acta*, **523**, 225-228.
75. Luchsinger B.P., Rich E.N., Yan Y., Williams E.M., Stamler J.S., Singel D.J. (2005) *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 912-921.
76. Legako J.A., White B.J., Harmon H.J. (2003) *Sensors and Actuators B: Chemical*, **91**, 128-132.
77. Di J., Zhang M., Yao K., Bi S. (2006) *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 247-252.
78. Castilho T.J., Sotomayor M.P.T., Kubota L.T. (2005) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **37**, 785-791.
79. Ткачук В.А. (1983) Введение в молекулярную эндокринологию, МГУ, Москва.
80. Lomillo M.A.A., Kauffmann J.M., Martinez M.J.A. (2003) *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 1165-1171.
81. Yu D., Blankert B., Kauffmann J.-M. (2007) *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 2707-2711.
82. Nebert D.W. Russell D.W. (2002) *Lancet*, **360**, 1155-1162.
83. Lewis D. F. V. (2001) *Guide to Cytochrome P450. Structure and function.* Taylor and Francis Eds., London and New York.
84. Kumar R.A., Clark D.S. (2006) *Current Opin. Chem. Biol.*, **10**, 162-168.
85. Балакин К.В., Иваненков Я.А. (2005) *Биомед. химия*, **51**, 384-412.
86. Cirspi C.L. (1999) *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.*, **2**, 15-19.
87. Criovori P., Pogessi I. (2006) *Eur. J. Medicinal Chem.*, **41**, 795-808.
88. Sakai-Kato K., Kato M., Homma H., Toyo 'oka T., Utsunomiya-Tate N. (2005) *Anal. Chem.*, **77**, 7080-7083.
89. Bernhardt R. (2006) *J. Biotechnol.*, **124**, 128-145.
90. Ivanov Yu.D., Govorun V.M., Bykov V.A., Archakov A.I. (2006) *Proteomics*, **6**, 1399-1414.
91. Gilles-Gonzalez M.-A., Gonzalez G. (2005) *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1-7.
92. Kalsorta A., Strobel H.W. (2006) *Pharmacol. Therapeutics*, **112**, 589-611.
93. Pikuleva I. (2006) *Pharmacol. Therapeutics*, **112**, 761-773.
94. Estabrook R. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 290-298.
95. Tsuchiya Y., Nakajima M., Yokoi T. (2005) *Cancer Letters*, **227**, 115-124.
96. Lathe R. (2002) *Steroids*, **12**, 967-977.
97. Hannemann F., Bichet A., Ewen K.M., Bernhardt R. (2007) *Biochem. Biophys Acta - General Subjects*, **1770**, 330-344.
98. Wu J.H., Croft K.D. (2007) *Mol. Asp. Med.*, **28**, 437-440.
99. Sacerdori D., Gatta A., McGriff J. (2003) *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, **72**, 51-71.
100. Gross G.J., Falck J.R., Isbell M., Moore J., Nithipatikom K. (2005) *Card. Res.*, **68**, 18-25.
101. Graville D.J., Gottlieb R. (2005) *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, **2**, 123-127.
102. Lisitsa A.V., Gusev S.A., Karusina I.I., Archakov A.I., Koymans L. (2001) *SAR QSAR Environ. Res.*, **12**, 359-366.
103. Smith D., Sadagopan N., Zientek M., Reddly A., Cohen L. (2007) *J. Chromatogr. B*, **850**, 455-463.
104. Bruno D.R., Njar V.C.O. (2007) *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 5047-5060.
105. Scritture C., Sparreboom A., Figg W. (2005) *Lancet Oncol.*, **6**, 780-789.

106. *Wiseman A., Levis D.* (2007) *Enzyme Microb. Technol.*, **40**, 1469-1474.
107. *Lee M.-Y., Park C.B., Dordick J.S., Clark D.S.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 983-987.
108. *Nelson S.D.* (1995) *Drug. Metab. Rev.*, **27**, 147-177.
109. *James L.P., Mayeux P.R., Hinson J.A.* (2003) *Drug. Metab. Dispos.*, **31**, 1499-1506.
110. *Brandon E.F., Raap C.D., Meijerman I., Beijnen J.H., Schellens J.H.* (2003) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **189**, 233-246.
111. *Persson K.P., Ekehed S., Otter C., Lutz M., VcPheat J., Masomirembwa C.M., Andersson T.B.* (2006) *Pharmacol. Research*, **23**, 56-69.
112. *Turpeinen M., Korhonen L.E., Tolonen A., Uusitalo J., Juvonen R., Raunio H., Felkonen O.* (2005) *Eur. J. Pharm. Sci.*, **24**, 123-132.
113. *Turpeinen M., Korhonen L.E., Tolonen A., Uusitalo J., Juvonen R., Raunio H., Felkonen O.* (2006) *Eur. J. Pharm. Sci.*, **29**, 130-138.
114. *Rilley R.J.* (2001) *Opin. Drug. Discov. Devel.*, **4**, 45-54.
115. *Burbaum J.J.* (1998) *Drug Discov. Today*, **3**, 313-322.
116. *Wolcke J., Ullmann D.* (2001) *Drug Discov. Today*, **6**, 637-646.
117. *Rodrigues A.D., Kukulka M.J., Surber B.W., Thomas S.B., Uchic J.T., Rotert G.A., Michel G., Thomekromer B., Machinist J.M.* (1994) *Anal. Biochem.*, **219**, 309-320.
118. *Zlokarnik G., Grootenhuis P.J., Watson J.B.* (2005) *Drug Discov. Today*, **10**, 1443-1449.
119. *Miller V.P.* (2000) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **919**, 26-32.
120. *Call J.J.* (2004) USP application 20040171099 Promega Corp.
121. *Kassel D.B.* (2004) *Opin. Chem. Biol.*, **8**, 339-345.
122. *Bistolas N., Wollenberger U., Jung C., Scheller F.W.* (2005) *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 2408-2423.
123. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Archakov A.I.* (2005) *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1051-1063.
124. *Udit A.K., Gray H.B.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 470-476.
125. *Alonso-Lomillo M.A., Gonzalo-Ruiz J., Domínguez-Renedo O., Muñoz F.J., Arcos-Marténez M.J.* (2008) *Biosens. Bioelectron.*, **23**, 1733-1737.
126. *Шумянцева В.В., Булко Т.В., Кузнецова Г.П., Саменкова Н.Ф., Лисица А.В., Пономаренко Е.А., Карузина И.И., Арчаков А.И.* (2007) *Биохимия*, **72**, 805-811.
127. *Шумянцева В.В., Булко Т.В., Кузнецова Г.П., Саменкова Н.Ф., Арчаков А.И.* (2009) *Биохимия*, **74**, 542-549.
128. *Liu S., Peng L., Yang X., Wu Y., He L.* (2008) *Anal. Biochem.*, **375**, 209-216.
129. *Murphy L.* (2006) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10**, 177-184.
130. *Yu X., Xu D., Cheng Q.* (2006) *Proteomics*, **6**, 5493-5503.
131. *Wang J.* (2006) *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1887-1892.
132. *Garry D.J., Kanatous S.B., Mammen P.P.A.* (2003) *Trends Card. Med.*, **13**, 111-116.
133. *Piras L., Reho S.* (2005) *Sensors and Actuators B: Chemical*, **111-112**, 450-454.
134. *Kagen L.J.* (1973). *Myoglobin: Biochemical, physiological and clinical aspects*, Colombian University Press, New York – London.
135. *Grenadier E., Keidar S., Kahana L., Alpan G., Marmur A., Palant A.* (1983) *Am. Heart J.*, **105**, 408-416.
136. *Ellis A.K., Saran B.R.* (1989) *Circulation*, **80**, 676-682.
137. *Gibler W.B., Gibler C.D., Weinshenker E., Abbothsmith C., Hedges J.R., Barsan W.G., Sperling M., Chen I.W., Embry S., Kereiakes D.* (1987) *Ann. Emerg. Med.*, **16**, 851-856.
138. *Zaninotto M., Altinier S., Lachin M., Celegon L., Plebani M.* (1999) *Am. J. Clin. Pathol.*, **111**, 399-405.
139. *Mair J., Morandell D., Genser N., Lechleitner P., Dienstl F., Puschendorf B.* (1995) *Clin. Chem.*, **41**, 1266-1272.
140. *Matveeva E.G., Gryczynski Z., Lakowicz J.R.* (2005) *J. Immunol. Meth.*, **302**, 26-35.
141. *Antman E., Bassand J.-P., Klein W., Ohman M., Sendon J.L.L., Ryden L., Simoons M., Tendera M.* (2000) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **36**, 959-969.

142. Арчаков А.И., Шумянцева В.В., Булко Т.В., Курнышова А.В., Вагин М.Ю. (2009) Патент на изобретение № 2367958. Электрохимический биосенсор для прямого определения миоглобина, способ его определения. Опубликовано в Бюллетене изобретений и открытий № 26.
143. McDonnell B., Hearty S., Leonard P., O'Kenedy R. (2009) *Clinical Biochem.* **42**, 549-561.
144. Brennan M.-L., Penn M.S., Lente F.V., Nambi V., Shishehbor M.H., Aviles R.J., Goormastic M., Pepoy M.L., McErlean E.S., Topol E.J., Nissen S.E., Hazen S.L. (2003) *New England J. Medicine*, **349**, 1595-1604.
145. Blankenberg S., Rupprecht H.J., Bickel C., Torzewski M., Hafner G., Tiret L., Smieja M., Cambien F., Meyer J., Lackner K.J. (2003) *New England J. Medicine*, **349**, 1605-1613.
146. Přibyl J., Skládal P. (2006) *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1952-1959.
147. Halámek J., Wollenberger U., Stöcklein W., Scheller F.W. (2007) *Electrochim. Acta*, **53**, 1127-1133.
148. Liu J., Guo C., Li C.M., Chi Q., Huang X., Liao Y.L., Yu T. (2009) *Electrochem. Commun.*, **11**, 202-205.
149. Pumera M., Sanchez S., Ichinose I., Tang J. (2007) *Sensors and Actuators B*, **123**, 1195-1205.
150. Compton R., Wildgoose G., Rees N., Strreter I., Baron R. (2008) *Chem. Phys. Letters*, **459**, 1-17.
151. Kerman K., Saito M., Yamamura S., Takamura Y., Tamiya E. (2008) *Trends Anal. Chem.*, **27**, 585-592.
152. Guo S., Wang E. (2007) *Anal. Chim. Acta*, **598**, 181-192.

Поступила: 22. 12. 2008.

SENSOR SYSTEMS FOR MEDICAL APPLICATION BASED ON HEMOPROTEINS AND NANOCOMPOSITE MATERIALS

V.V. Shumyantseva¹, E.V. Suprun¹, T.V. Bulko¹, O.V. Dobrinina², A.I. Archakov¹

¹Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya Street, 10,
Moscow 119121, Russia; tel.: +7 499 246 58 20; fax: +7 499 245 08 57;
e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

²Russian State Medical University, Moscow 117997, Ostrovityanova str., 1

Recent advances in nanotechnologies stimulate the development of sensor systems based on nanocomposite materials. This review discusses the prospects and challenges of sensors coupled with functionally important for medicine hemoproteins and nanoscale materials. Authors summarized their own experimental results and literature data on hemoprotein-based sensor systems. Mechanisms and the main function principles of electrochemical nanosensors are also discussed.

Key words: hemoproteins, electrochemical biosensors, nanocomposite materials, peroxidase, cytochrome P450, hemoglobin, myoglobin.