

## ОБЗОРЫ

---

УДК 577.152.1

©Москалева, Згода

### СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ЦИТОХРОМОВ P450

*Н.Е. Москалева\*, В.Г. Згода*

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
"Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В.Н. Ореховича" Российской академии медицинских наук, 119121, Москва,  
Погодинская ул., 10; эл. почта: nemoskaleva@gmail.com

Обзор посвящен определению концентрации и измерению активности цитохромов P450. Рассмотрено применение современных методов протеомного анализа, таких как электрофорез и хромато-масс-спектрометрия, к рассматриваемому классу белков, при этом наибольшее внимание уделено целевому масс-спектрометрическому количественному анализу цитохромов P450 в биологических объектах. Также в статье исследованы методы определения активности цитохромов P450 и вопросы сопоставления активности и результатов количественного анализа данного класса белков.

**Ключевые слова:** количественная протеомика, цитохромы P450, масс-спектрометрия.

**ВВЕДЕНИЕ.** В настоящее время особую актуальность приобретают вопросы оптимизации и персонализации фармакотерапии. Известно, что различия в скорости метаболизма лекарственных средств у разных людей часто оказываются причиной неадекватного фармакологического ответа на введение лекарств, поэтому развитие персонализированной медицины невозможно без изучения метаболизма лекарственных препаратов и ответной реакции организма на препарат [1].

Ключевая роль в метаболизме ксенобиотиков принадлежит ферментам суперсемейства цитохромов P450 [2], которые представляют собой гем-содержащие монооксигеназы и входят в состав микросомальной монооксигеназной системы. Система локализована на мембранах эндоплазматического ретикулума и включает, кроме цитохрома P450, NADPH -цитохром-P450-редуктазу и цитохром b<sub>5</sub> [2].

Цитохромы P450 широко распространены в природе и обнаружены во всех аэробных организмах. В настоящее время получены геномные последовательности для более чем 12400 цитохромов P450, представляющих десятки и сотни семейств и подсемейств, соответственно [3]. Изоферменты цитохрома P450 - представители разных семейств и подсемейств - отличаются субстратной специфичностью и регуляторами активности (ингибиторами и индукторами), однако, некоторые из них могут иметь перекрестную субстратную специфичность, одинаковых ингибиторов и индукторов. В настоящее время у человека идентифицировано 58 форм цитохрома P450, 12 из которых участвуют в метаболизме ксенобиотиков [4]. Причём в метаболизме лекарственных средств, в основном, принимают участие изоферменты семейств I, II и III; в частности, изоферменты CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 катализируют около 90% реакций гидроксилирования лекарственных соединений [4].

---

\* - адресат для переписки

Активность монооксигеназной системы в отношении того или иного лекарственного препарата определяется главным образом концентрацией и функциональной способностью, то есть активностью специфичных для него изоформ цитохрома P450. Другие компоненты монооксигеназной системы NADPH-зависимая редуктаза и цитохром  $b_5$ , как правило, не являются лимитирующими факторами в монооксигеназных реакциях [2]. Поэтому, индивидуальные особенности метаболизма лекарственных соединений, определяются персональным профилем - концентрацией и активностью цитохромов P450 [1].

Химические соединения, особенно лекарственные средства, могут влиять на содержание и активность цитохромов P450, как повышая функциональную способность (индукция), так и снижая её (ингибирование). Свойства индукторов или ингибиторов ферментов могут проявлять не только лекарственные средства, но и компоненты пищи, загрязнители воздуха и воды, соединения, содержащиеся в табачном дыме, алкоголь [1, 4]. Кроме того, изучение межлекарственных взаимодействий на уровне изменения активности монооксигеназной системы имеет важное значение при разработке новых лекарственных препаратов.

Развитие фармакотерапии и её персонификация требует создания моделей для изучения воздействия лекарственных препаратов и ответной реакции организма. Для создания таких моделей необходимо проведение селективного изоформспецифичного количественного анализа цитохромов P450 в биологических объектах для выявления диапазонов вариаций концентраций ферментов в норме и при воздействии различных факторов и установления взаимосвязей между содержанием цитохромов P450 и их активностью.

В настоящем обзоре рассмотрены методы определения содержания белков суперсемейства цитохромов P450 и их активности в биологических объектах.

## **1. МЕТОДЫ АНАЛИЗА ЦИТОХРОМОВ P450 В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ.**

### *1.1. Дифференциальная спектроскопия.*

Одним из первых способов определения содержания цитохромов P450 был метод дифференциальной спектроскопии, основанный на анализе характеристического спектроскопического сдвига, появлявшегося в результате связывания CO с восстановленным атомом железа гема [5, 6]. Дифференциальная спектроскопия позволяет определить содержание каталитически активной формы цитохрома P450 в сложных биологических системах без необходимости выделения фермента. Однако, несмотря на устойчивость и широкую распространенность методики у неё есть серьезные ограничения. Первым из них является необходимость высоких концентраций цитохрома P450 для проведения точных измерений. Кроме того, дифференциальная спектроскопия позволяет измерить только суммарную концентрацию цитохромов P450, не позволяя проводить дифференцированный изоформспецифичный анализ [5].

*1.2. Оценка уровня экспрессии цитохромов P450 по количеству соответствующего мРНК.*

В работах [7-10] для оценки экспрессии белка использован анализ соответствующих мРНК, однако, авторы [7, 10] делают вывод, что корреляции между уровнем мРНК и соответствующего белка часто невысоки, то есть содержание белка регулируется в значительной степени посттранскрипционными и трансляционными механизмами. Так, при сопоставлении результатов исследования экспрессии цитохромов P450 в лёгких на уровне мРНК, определения активности и целевого анализа белка получены противоречивые результаты для CYP1A2, CYP2C и CYP2D6 [8]. Более того, присутствие и количество мРНК не всегда означает наличие белка [11].

### *1.3. Иммунологические методы анализа.*

Более информативными методами количественного анализа цитохромов P450 являются иммунологические, такие, как ELISA или Вестерн блот. Согласно исследованиям Edwards с соавт. [12] и Alterman с соавт. [13], для получения

антител к цитохромам P450 в качестве иммуногенов можно использовать синтетические пептиды, варьируя последовательность которых можно создавать антитела, специфичные к определенным изоформам P450. В статье Edwards с соавт. для получения антител использованы пептиды, соответствующие четырём-пяти С-концевым аминокислотным остаткам последовательности P450. При этом полученные антитела проявляли высокую специфичность для определения суперсемейства цитохромов P450 в микросомальной фракции или гомогенате печени. Однако, антитела проявляли перекрестную специфичность для белков с одинаковыми С-концевыми фрагментами, например, для ферментов одного подсемейства, таких как CYP3A4 и CYP3A7 [12].

Alterman с соавт. [13] разработали методику количественного анализа человеческих CYP2E1, CYP1A2 и CYP2C19 при помощи иммунохимических методов и масс-спектрометрии, которая была апробирована на тестовых образцах смеси рекомбинантных белков. Для каждого белка были выбраны пептиды с уникальной последовательностью, которые использовали как для получения антител, так и для количественного анализа при помощи MALDI-TOF/MS (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация). Авторы статьи отмечали трудности определения концентраций белка при помощи MALDI-TOF/MS, связанные с гетерогенностью кристаллизации образца, эффектом гашения ионизации компонентами матрицы и возможностью перекрывания спектров в случае присутствия в пробе пептидов с близкими массами.

Несмотря на коммерческую доступность некоторых антител, распознающих целевые изоформы CYP, авторы статей [12-14] сделали вывод, что непосредственное и одновременное количественное измерение цитохромов P450, принадлежащих к одному подсемейству остаётся трудной задачей. Так, создание изоформспецифичных антител к цитохромам P450 осложняется высокой степенью гомологии, наблюдаемой как в пределах одного семейства цитохромов, так и между семействами. Кроме того, необходимым условием измерения концентраций P450 с использованием иммунологических методов является наличие высокоочищенного белка для построения калибровочных кривых [14].

## 2. МЕТОДЫ ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА ЦИТОХРОМОВ P450.

Протеомные методы анализа, как правило, включают стадии предварительного разделения белков или пептидов и последующей идентификации белков методами масс-спектрометрии или с использованием иммунологических подходов [15].

### 2.1. Методы предварительного разделения белков суперсемейства P450 в протеомике.

Электрофоретические методы широко используются при непосредственном анализе белков в биологических системах, а также для предварительного фракционирования образцов перед масс-спектрометрическим определением. В работах [16-21] использовали двумерный (2-DE) и одномерный (1-DE) электрофорез для разделения гидрофобных мембранных белков и, в частности, цитохромов P450. Так, Galeva и Alterman [16] после идентификации пятен на 2-DE при помощи MALDI-TOF/MS, пришли к выводу, что, несмотря на высокую разрешающую способность 2-DE, метод 1-DE более подходит для анализа цитохромов P450. Причиной этому является высокая гидрофобность и склонность к агрегации при проведении первой стадии 2-DE - электрофокусирования [16-19]. При анализе микросом печени мышей при помощи 1-DE изоформы 3A1, 2C11, 2D2, 2D5, 2A1, 2B1 и 2B2 идентифицированы как в контрольных образцах, так и в образцах, полученных от животных после индукции феноталом, в то время как методом 2-DE исследователям удалось обнаружить только изоформы 2B1 и 2B2 в индуцированном феноталом образце [16].

К такому же выводу пришли и Petushkova с соавт. [17, 18], в статье которых приведены результаты оптимизации условий 1-DE и определены диапазоны локализации различных изоформ цитохромов P450 в геле, идентифицированных при помощи MALDI-TOF/MS. В данной работе было

проведено исследование профиля цитохромов P450 и их активности в образцах микросом печени человека с диагнозом рак толстой кишки, по сравнению с контрольными образцами, полученными от пациентов без этой патологии. При этом на электрофореграммах, полученных методом 2-DE, пятен, принадлежащих цитохромам P450 не обнаружено, а использование 1-DE в сочетании с MALDI-TOF/MS позволило идентифицировать 11 изоформ цитохромов P450-2A6, 2C8, 2C9, 2C10, 2D6, 2E1, 3A4, 4F2, 1B1, 4A11 и 1A2. По данным этих авторов, область, содержащая цитохромы P450, находится между карбоксиэстеразой (62,5 кДа) и актином (41,0 кДа) [17].

При использовании 1-DE после разделения белков пробы подвергали ферментативному гидролитическому расщеплению, а образовавшиеся пептиды анализировали при помощи обращенно-фазовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (RPLC-ESI-MS/MS) [15].

В подходах без использования электрофореза начальной стадией является гидролитическое ферментативное расщепление пробы для получения пептидов, которые затем подвергаются разделению на хроматографических колонках на основании их физико-химических свойств [15]. Так, первым этапом разделения может быть фракционирование на ионообменной колонке с последующим анализом каждой фракции при помощи обращенно-фазовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (двумерная хроматография 2-D LC/MS). Для улучшения разрешения технологии и, соответственно, увеличения числа идентифицированных белков в качестве первого направления разделения белков используют гель-фильтрацию, изоэлектрофокусировку, обращенно-фазовую хроматографию нативных белков. Таким образом, в сочетании с применением RPLC-ESI-MS/MS можно получить трёхмерное хроматографическое (3-D LC) разделение белков и пептидов, которое позволяет идентификацию более чем 10000 белков в одном эксперименте [15].

Zgoda с соавт. [21] сравнили электрофоретические и хроматографические методы фракционирования для мембранных белков и их пептидов в ходе протеомных исследований. В статье рассмотрены результаты масс-спектрометрического анализа микросом печени мыши после 1-DE, двумерной и трёхмерной хроматографии. Zgoda с соавт. показали, что 3-D LC, первым этапом которой является разделение нативных белков на специальной колонке mRP-C18, с последующим разделением пептидов данных белков методами ионообменной и обращенно-фазовой хроматографии, позволяет добиться наибольшего количества идентифицированных белков, а также более полного представления изоформ цитохромов P450 в результатах анализа [21].

## 2.2. Масс-спектрометрический анализ цитохромов P450.

В настоящее время самым информативным инструментом для анализа цитохромов P450 в биологических объектах является масс-спектрометрия [15, 22]. Причём, если ранее основной целью масс-спектрометрии в протеомных исследованиях являлась идентификация белка, то в настоящее время приоритетными становятся количественные оценки. Количественный анализ белков в биологических объектах представляет собой нетривиальную задачу вследствие сложности самого протеомного анализа, в ходе которого необходимо идентифицировать и количественно оценить тысячи белков, концентрация которых может различаться на несколько порядков [15]. Однако, в настоящее время количественная оценка белков, среди которых важную роль играют цитохромы P450, необходима для моделирования процессов происходящих в организме, установления связи между фенотипом и генотипом, при разработке новых лекарств.

Факторами, усложняющими разработку методики изоформспецифичного масс-спектрометрического анализа цитохромов P450, являются высокая гомология между белками в одном семействе, а зачастую и между семействами [22]. Несмотря на это, использование возможностей масс-спектрометрии для количественного анализа цитохромов P450 очень перспективно, так как целевые направленные



методы позволяют проводить детекцию изоформспецифичных пептидов, для которых незначительная разница в первичной структуре, такая как единичная аминокислотная замена достаточна для дифференцированного анализа [22].

#### 2.2.1. Идентификация цитохромов P450 в биологических объектах.

Первые работы, посвященные масс-спектрометрии цитохромов P450, были направлены главным образом на идентификацию белков в биологических объектах. Так, в уже упоминавшейся работе Petushkova с соавт. методом MALDI-TOF/MS исследованы цитохромы P450 в образцах микросом печени человека с диагнозом рак толстой кишки, по сравнению с контрольными образцами, полученными от пациентов без этой патологии [17]. Авторам удалось идентифицировать 11 изоформ цитохромов P450 (1A2, 1B1, 2A6, 2C8, 2C9, 2C10, 2D6, 2E1, 3A4, 4A11, 4F2), причем CYP1B1 и CYP4A11 обнаружены только в пораженной опухоли ткани, а CYP1A2 - только в контрольных образцах. Проведенное сравнение активности цитохромов P450 по отношению к маркерным субстратам и результатов протеомного исследования показало, что активности по отношению к 7-этокси- и 7-метоксирезеруфину, которые являются маркерными субстратами для изоформ 1A1 и 1A2, в образцах с патологией снижены в 5-10 раз, в то время как масс-спектрометрический сигнал, полученный от данных белков не достигал уровня, необходимого для надежной идентификации [17].

В работе [23] протеомный подход MALDI-TOF/MS использован для анализа цитохромов P450 в образцах печени кролика и крысы, что дало возможность селективно детектировать CYP4A1, CYP4A3, CYP2A1, CYP2B1, CYP2B2, CYP2C11, CYP2D2, и CYP2D5. Белки микросом печени крыс контрольной группы и после индукции фенотербиталом и клофибратом на первом этапе анализировали при помощи 1-DE, при этом для проведения трипсинолиза и масс-спектрометрического анализа была выбрана область геля в диапазоне от 45 до 60 Да. Использование MALDI-TOF/MS для анализа пептидов позволило дифференцировать CYP2B1 и CYP2B2, имеющих гомологию 97% и различающихся на 14 аминокислот из 491 [23]. В микросомах кролика после индукции фенотербиталом помимо вышеперечисленных изоформ P450 обнаружены CYP1A1, CYP1A2, CYP2B4, CYP4B1 и CYP2A10 [23].

Более надежным методом профилирования цитохромов P450 является обращенно-фазовая жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией и электроспрейной ионизацией (RPLC-ESI-MS/MS) [15, 21]. В ряде работ идентификация цитохромов P450 была получена в рамках общего протеомного анализа [24-26]. Так, в работе [24] при протеомном анализе эндоплазматического ретикула пораженных опухолью, индуцированной афлатоксином B1, тканей печени крыс обнаружено уменьшение экспрессии цитохромов P450 по сравнению с контрольными образцами. В работах [25, 26] методами 2D-LC исследован эффект увеличения экспрессии цитохромов P450 в печени крысы после введения животным фенотербитала. В работе [26] показано, что при общем увеличении содержания цитохромов наибольший эффект наблюдается для изоформы CYP 2B2. Протеомный подход RPLC-ESI-MS/MS Nisar с соавт. [27] использовали для идентификации 24 изоформ цитохромов P450 в печени крысы. Оказалось, что уровень экспрессии некоторых ферментов зависел от пола животного. Так, CYP2C11, CYP2C22, 2C13 и CYP2D5 обнаружены у крыс-самцов и не наблюдались у самок, в то время как CYP2C12, CYP2C23, 2C24 и CYP2D4 найдены только у самок.

#### 2.2.2. Методы количественного масс-спектрометрического анализа.

Наряду с вопросами идентификации цитохромов P450 в биологических объектах актуальной задачей в настоящее время является исследование их количественного содержания. Количественный анализ в протеомике традиционно проводится двумя путями, первый из которых основан на сравнении контрольного и опытных состояний биологической системы, что выражается в относительной количественной оценке изменений происходящих в результате каких-либо воздействий [15].

Относительная количественная оценка может быть достигнута путём непосредственного сравнения интенсивности масс-спектрометрических сигналов (площадей под хроматографическими пиками), либо числа tandemных масс-спектров, полученных для различных образцов (метод подсчета спектров). Этот количественный анализ в протеомике получил название “определение концентрации без изотопной метки” (Label free quantitation) [15, 22, 28, 29].

Другой способ основан на введении в анализируемые белки (пептиды) стабильных изотопов, включенных в состав аминокислот, либо в виде модификации боковых групп аминокислот [15, 22, 28, 29]. Стабильные изотопы могут быть введены в состав белка различными способами [28]. Например, в процессе трансляции, когда белки синтезируются в клетках инкубируемых в среде аминокислот, содержащих стабильные изотопы  $^{13}\text{C}$  и/или  $^{15}\text{N}$ . Это, так называемый, SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture) способ мечения белков [30]. Для высших организмов изотопномеченные аминокислоты могут поступать с пищей, однако этот метод не применим для человеческих образцов и очень дорог [32-34]. Отдельные пептиды с включенными изотопно-меченными аминокислотами могут быть химически синтезированы и использованы для измерения абсолютных концентраций белков (AQUA, "absolute quantification") [31].

Более распространенными являются методы, основанные на химической модификации белков или их пептидов [15, 22, 28, 29]. Для этого чаще всего используются дериватизирующие агенты, которые существуют в различных формах - тяжёлых и лёгких - в зависимости от того тяжёлые или лёгкие изотопы они содержат. При сравнении двух образцов аминокислоты белков химически модифицируются агентом содержащим либо лёгкие, либо тяжёлые стабильные изотопы. После проведения реакции химического мечения образцы смешиваются и анализируются вместе. Количественную информацию получают при сравнении масс-спектрометрических сигналов пептидов модифицированных тяжёлой и лёгкой формой метки. Таким же образом можно проводить абсолютный количественный анализ с использованием внутренних стандартов, для абсолютного количественного определения белка в исследуемых образцах с тяжёлой меткой [15, 22, 28, 29].

Примерами реакций дериватизации, применяемых для введения изотопных меток, являются ацилирование остатков лизина с использованием дейтерированного уксусного ангидрида [35], гуанидирование N-концевой группы и аминогрупп лизина [36, 37] и метилирование аминогрупп пептида [38, 39]. Кроме того, существует целый ряд коммерчески доступных дериватизирующих агентов, таких как ICAT (isotope-coded affinity tag), усовершенствованный расщепляемый вариант cICAT (Cleavable Isotope Coding Affinity Tag), ICPL (isotope-coded protein label) и некоторые другие [40-43].

Для количественного анализа на уровне фрагментарных ионов разработан метод iTRAQ ("isobaric Tagging Reagents Amino-reactive Quantification"). Изотопная метка iTRAQ связывается с N-концевым участком полипептидной цепи или боковой  $\epsilon$ -аминогруппы лизина и состоит из двух групп - балансера и репортера, которые представляют собой N-пиперазиновую и карбонильные группы [44]. Дериватизирующие реагенты разработаны таким образом, чтобы массы балансера и репортера варьировались за счёт разного содержания изотопов  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  и  $^{18}\text{O}$  от 114 до 117 Да и от 28 до 31 Да, соответственно, но их сумма оставалась постоянной. Меченые пептиды элюируются одновременно при хроматографическом разделении, продуцируют одинаковые величины  $m/z$  в масс-спектре, но различаются по спектрам фрагментации, где ионы репортера представлены сигналами с  $m/z$  114, 115, 116 и 117 Да, для 4-х изобарных меток, соответственно. Соотношение сигналов ионов 114, 115, 116 и 117 Да в спектре фрагментации соответствует соотношению концентраций белка в образцах [45, 46].

Одним из ранних является метод введения стабильных изотопов, используя  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  и  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  в процессе ферментативного гидролиза белков [47-55]. В протоколе, который приведен в статье Fenselau с соавт. [48], один образец обрабатывали трипсином в буфере, приготовленном с  $\text{H}_2^{16}\text{O}$ , а другой в присутствии  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ . Образцы объединяются перед анализом. При применении  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  изотопного мечения образуются триптические пептиды, меченые по С-концу. Для оценки результатов разработаны подробные протоколы, детали которых описаны в статьях Ramos-Fernandez с соавт. [49] и Lopez-Ferrer с соавт. [50].

*2.2.3. Относительное масс-спектрометрическое количественное определение цитохромов P450 без использования изотопной метки.*

Пример количественного анализа цитохромов P450 без использования изотопной метки при помощи MALDI-TOF/MS приведен в работе Alterman с соавт. [56]. Две изоформы цитохрома P450 мыши (CYP2B1, CYP 2B2) и три человека (CYP1A2, CYP 2E1 и CYP2C19) количественно определяли с использованием одного изоформспецифичного пептида, синтезированного для каждого белка. Метод, апробованный на тестовом образце рекомбинантных цитохромов P450, показал значения большие, чем СО-спектрофотометрия, которая измеряет содержание только активной формы фермента.

Более информативными являются методы, основанные на хроматографическом разделении компонентов пробы в сочетании с tandemной масс-спектрометрией и электроспрейной ионизацией (RPLC-ESI-MS/MS). В статье Duan с соавт. [57] предложен метод количественного анализа человеческих CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 и CYP3A4, основанный на хлорировании остатков цистеина в анализируемых образцах и бромировании в стандарте. Ошибка определения концентрации человеческих CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 и CYP3A4, добавленных в матрицу из микросом печени мыши, составляла менее 20% в диапазоне концентраций от 10 фмоль/мкг до 5 пмоль/мкг. К сожалению, анализ реальных образцов в статье не описан.

Метод относительной количественной оценки содержания цитохромов P450 в пробах человеческих микросом одновременно с их идентификацией по данным общего протеомного исследования использовали в статье Seibert с соавт. [58]. Эти авторы предложили сравнивать индексы относительного содержания белка (emPAI), которые представляют собой экспоненциально модифицированное отношение числа обнаруженных пептидов, к числу пептидов, которые можно детектировать для данного белка.

$$\text{PAI} = N_{\text{обн}}/N_{\text{теор}},$$

где  $N_{\text{обн}}$  - число пептидов, обнаруженное для исследуемого цитохрома P450 при обработке данных протеомного анализа, а  $N_{\text{теор}}$  - теоретически возможное число пептидов.

$$\text{emPAI} = 10^{\text{PAI}} - 1$$

Для оценки относительного содержания изоформы от общего количества цитохромов P450 авторы использовали формулу

$$\text{содержание (\%)} = [(\text{emPAI} \cdot \text{Mr}) / \Sigma(\text{emPAI} \cdot \text{Mr})] \cdot 100,$$

где Mr - молекулярная масса изоформы, а  $\Sigma(\text{emPAI} \cdot \text{Mr})$  сумма произведений emPAI и Mr для всех обнаруженных изоформ цитохромов P450.

На основании полученных данных идентифицированные изоформы P450 были разделены на три категории - с высокой, средней и низкой концентрацией. Согласно расчётам исследователей, высокую концентрацию имеют изоформы CYPs 1A2, 2A6, 2C9, 2E1 и 3A4, содержание каждой из которых составляет около 10% от общего количества цитохромов P450, среднюю - 2C8, 4A11 и 4F2 (0,5-1%) и группа цитохромов с низкой концентрацией (<0,5%) представлена изоформами 2B2, 2J2, 4F11, 4F12, 4V2, 7B1, 8B1, 20A1 и 51A1. Однако авторы отмечают, что количественные оценки по emPAI сильно зависят от метода анализа

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ЦИТОХРОМОВ P450

и аналитического оборудования [58]. Так, например, изоформу 3A4 анализировали тремя методами; при этом анализ при помощи ионной ловушки после разделения 1DE показал, что содержание составляет 28,6% от общего количества цитохромов P450. Анализ на Q-TOF после 1DE дает результат 10,4%, а после 2D-LC - 16,4% от общего количества цитохромов P450. Более точные результаты были получены целевым количественным анализом с использованием изотопно-меченых пептидов в качестве стандарта и масс-спектрометра с тройным квадруполом (QQQ). Так, используя синтетические протеотипические пептиды, авторы определили концентрации изоформ CYP 2E1 и CYP 1A2 в трёх образцах человеческих микросом, которые составляют 88-200 и 163-263 пмоль/мг белка, соответственно [58].

*2.2.4. Использование методов с введением изотопной метки для масс-спектрометрического анализа цитохромов P450.*

Для относительного количественного анализа цитохромов P450 Jia с соавт. [35] использовали в своей работе ацетилирование N-концевой аминокислотной группы пептидов D6-уксусным ангидридом с последующим анализом при помощи масс-спектрометра высокого разрешения. В процессе исследования влияния четыреххлористого углерода на экспрессию цитохромов P450 в печени крысы исследователи идентифицировали 17 изоформ цитохромов P450; при этом концентрация 2C11, 3A2 и 2E1 снижалась при воздействии четыреххлористого углерода более чем в два раза, а 2C6, 2B2, и 2B1 увеличивалась в 1,7, 3,9 и 4 раза, соответственно. Подробные результаты этой работы представлены в таблице 1.

*Таблица 1. Относительные изменения содержания цитохромов P450 в микросомах печени крысы после воздействия четыреххлористым углеродом (по Jia с соавт. [35] с изменениями).*

Обнаруженная изоформа CYPs	Отношение интенсивности пептидов в пробе после обработки к контрольному образцу
2C11	0,34±0,03
3A2	0,35±0,02
2E1	0,55±0,04
2C6	1,74±0,02
2B2	3,88±0,47
2B1	4,07±0,06
2D26	1,06±0,02
2C13	0,86±0,11
2D10	1,47±0,02
2C7	1,15±0,05
2A1	1,04±0,07
2C23	1,15±0,33
2B3	0,99±0,03
1A2	0,76±0,09
4A2	1,20±0,29
2C12	1,62±0,01
2C70	0,66±0,06

Половые различия в содержании цитохромов P450 в печени крысы исследованы в работе Huang с соавт. [59]. Относительный количественный анализ был выполнен методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии с введением изотопной метки при метилировании образцов D- или H-формальдегидом. В процессе протеомного анализа идентифицирована 21 изоформа цитохромов P450, из которых CYP 2C11, 2C13, 2B3, 2C70, 3A2 более специфичны для самцов, а CYP 2A1, 2C7, 2D26 - для самок.



В статье Jenkins с соавт. [42] описан относительный и абсолютный количественный анализ цитохромов P450 в микросомах печени мыши контрольной группы и после индукции фенobarбиталом и метилхолантеном с использованием цистеин специфичного ICAT реагента. Данный количественный подход дал исследователям возможность идентифицировать три группы белков подсемейства 2C (CYP2C29/CYP2C37/CYP2C50, CYP2C38/CYP2C39 и CYP2C40) и выявить различную реакцию CYP2C29, CYP2C40 и CYP2C50 на химические стимуляторы. При этом в отличие от CYP2C40 и CYP2C50, экспрессия CYP2C29/39 после введения фенobarбитала увеличивалась в 2-3 раза, а для подсемейства CYP2B - в 4-13 раз. Кроме того, авторы статьи привели данные о более сильном увеличении экспрессии CYP1A1 по сравнению с изоформой CYP1A2 при индукции метилхолантеном. В качестве недостатка данного подхода авторы статьи отмечают невозможность дифференциации членов подсемейств 3A, 2B и 2D, так как количественная оценка ICAT основана только на цистеинсодержащих пептидах, которые в данных подсемействах идентичны. К тому же число остатков цистеина в большинстве P450 не превышает 4-х и, как правило, они расположены в консервативных участках последовательности P450, что накладывает ограничения на использование ICAT.

Для абсолютного количественного анализа в работе Jenkins с соавт. были синтезированы пептиды 16 индивидуальных изоформ подсемейств 1A, 1B, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2J, 3A и 4A. При этом, измеренные концентрации белков находились в пределах 10-100 фмоль/мкг белка. В статье отмечено, что метод абсолютного количественного анализа обеспечил более высокую чувствительность и точность выполнения измерений. Так, например, цитохромы подсемейства 4A концентрация которых, согласно измерениям авторов, составила 2,71 фмоль/мг, были обнаружены только при целевом абсолютном количественном анализе [42]. Концентрации изоформ цитохромов P450 в контрольных пробах и после индукции фенobarбиталом приведены в таблице 2 (выделены цитохромы P450, концентрация которых значительно меняется под воздействием фенobarбитала).

Таблица 2. Концентрации цитохромов P450 в контрольных пробах и после индукции фенobarбиталом (по Jenkins с соавт. [42] с изменениями).

Изоформа P450	Пептид	Концентрация в контроле, фмоль/мкг белка	Концентрация после индукции фенobarбиталом, фмоль/мкг белка
1A1	CIGETIGR	5,38 ± 0,35	5,21 ± 1,14
1A2	CIGEIPAK	1,38 ± 0,24	1,25 ± 0,18
1B1	CIGEELSK	14,11 ± 1,01	14,99 ± 0,51
2A4	YCFGEGLAR	11,53 ± 1,22	13,02 ± 0,26
2A12	FCLGDSLAK	15,07 ± 1,62	14,99 ± 1,32
<b>2B9/10/13/20</b>	<b>ICLGESLAR</b>	<b>11,41 ± 1,95</b>	<b>68,97 ± 5,24</b>
<b>2C29/37/50</b>	<b>ICAGEGLAR</b>	<b>55,84 ± 4,03</b>	<b>171,18 ± 23,03</b>
2C38/38	VCAGEGLAR	7,58 ± 1,09	7,48 ± 0,96
2C40	ICVGESLAR	16,15 ± 1,93	15,85 ± 1,97
2D9/11	SCLGEALAR	12,42 ± 0,70	7,56 ± 1,39
2D10/22/26	SCLGEPLAR	21,68 ± 1,05	19,61 ± 0,42
2E1	VCVGEGLAR	35,13 ± 1,58	30,38 ± 2,78
2F2	LCLGEPLAR	21,74 ± 3,34	3,34 ± 16,27
2J5	ACLGEQLAK	9,05 ± 0,94	8,82 ± 0,62
<b>3A11/13/16</b>	<b>NCLGMR</b>	<b>5,48 ± 0,63</b>	<b>19,56 ± 1,16</b>
4A10/11/12/14	NCIGK	2,71 ± 0,86	4,32 ± 0,93

Wang с соавт. [60] для относительного количественного анализа цитохромов P450 в здоровой печени человека и в тканях карциномы печени использовал метод iTRAQ (isobaric Tagging Reagents Amino-reactive Quantification). Эквивалентные по содержанию общего белка пробы микросом здоровой печени и поражённой ткани подвергали ферментативному расщеплению, после чего пептиды модифицировали различными вариантами изобарной метки iTRAQ-114 и iTRAQ-117. После объединения проб и анализа при помощи 2D-LC-MS/MS авторы обнаружили пониженное содержание CYP2D6 в тканях пораженных карциномой, относительно здоровой ткани.

В работе Lane с соавт. [61] описан метод введения стабильных изотопов в процессе ферментативного расщепления, используя  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  и  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ , для профилирования цитохромов P450 печени мыши после обработки 1,4-бис-[2-(3,5-дихлоропиридилокси)]бензолом (ТСРОВОР). В работе идентифицировано 17 изоформ P450, для 16 из которых проведён количественный анализ. Метод позволил дифференцировать такие изоферменты, как CYP2B10 и 2B20 (87% идентичности в аминокислотной последовательности), CYP2C29, 2C37 и 2C38 (71% аминокислотной последовательности идентично).

Wang с соавт. [62] провели абсолютное количественное определение CYP2E1 в образце человеческой печени с использованием одного изоформспецифичного пептида. В качестве внутреннего стандарта к пробе был добавлен изотопно-меченый пептид GTVVVPT(\*L)DSVLYDNQEFDPDEK (\*L остаток лейцина, меченый шестью  $^{13}\text{C}$  и одним  $^{15}\text{N}$ ), который уникален для человеческого CYP2E1. Далее образец анализировали при помощи QQQ и содержание CYP2E1 в нем оценено в 100 фмоль/мкг общего белка.

Метод “абсолютной калибровки” (AQUA) с изотопно-мечеными синтетическими пептидами в качестве стандартов и анализом при помощи QQQ был использован для количественного определения CYP2D6 в работе Langenfeld с соавт. [63]. Исходя из анализа 30 образцов микросом печени человека индивидуальная вариабельность концентраций 2D6 составляет от 0,8 фмоль/мкг до 81 фмоль/мкг микросомального белка, а в образцах от индивидуумов с двумя нулевыми аллелями (\*3, \*4, \*5; РМ генотип) концентрация практически равна нулю. Полученные результаты хорошо коррелируют с активностью фермента, определенной по гидроксированию декстрометорфана.

В работе Wang с соавт. [14] проведен количественный анализ содержания CYP3A4 и CYP3A5 в пробах микросом человека. В качестве стандартов были взяты пептиды, полученные после трипсинолиза рекомбинантных цитохромов P450, а соответствующие изотопно-меченые синтетические пептиды использованы как внутренние стандарты для контроля воспроизводимости методики и эффективности ионизации. Полученные средние значения концентраций для CYP3A4 и CYP3A5 составляли 67 и 4 пмоль/мг микросомального белка, соответственно. При этом индивидуальная вариабельность содержания составляла более чуть менее 2-х порядков для CYP3A5 (от 0,3 до 20 фмоль/мкг) и около 30 раз для CYP3A4 (от 9 до 322 фмоль/мкг).

В статье Kawakami с соавт. [64] метод AQUA использовали для масс-спектрометрического определения 11 изоформ микросомальных цитохромов P450 человека. Авторы отмечают сложность выбора протеотипических пептидов для количественного анализа вследствие высокой гомологии между изоформами. При этом пептиды не должны содержать химически лабильных аминокислот, пропущенных сайтов трипсинолиза и известных посттрансляционных модификаций. В ходе предварительного общего протеомного исследования образца выявить такие пептиды для всех интересующих изоформ авторам не удалось, поэтому были исследованы теоретические пептиды, отклик которых подтверждался при помощи направленного протеомного анализа.

Для каждого белка синтезировали по одному изотопно-меченому пептиду и после предварительной калибровки определяли концентрации исследуемых цитохромов P450 в 10 образцах человеческих микросом. По мнению авторов, 5 изоформ классифицируются как высококопийные, это 2C9, 2E1, 1A2, 2C8, 3A4, которые присутствуют в концентрации более 8 фмоль/мкг микросомального белка. Цитохромами с низкой экспрессией являются 2C19, 3A5, 3A43, 2B6 - с содержанием менее 2 фмоль/мкг микросомального белка. Содержание CYP 2A6 и 2D6 находится в пределах между 2-8 фмоль/мкг микросомального белка. При этом уровень экспрессии в различных индивидуальных образцах варьировал в 10-20 раз [64].

### **3. ФЕНОТИПИРОВАНИЕ КАК СПОСОБ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ.**

Применительно к медицинской практике, когда возникает необходимость оценить функциональную и детоксицирующую функцию печени или предсказать возможность токсического эффекта того или иного лекарства, важным параметром является функциональная способность монооксигеназной системы к окислению субстратов. Для измерения активности P450 определяется концентрация образующего маркерного метаболита. Согласно литературным данным, для определения активности используют методы, основанные на определении продуктов ферментативной реакции с использованием ВЭЖХ с УФ или масс-спектрометрическим детектированием, измерении радиоактивности, флуоресценции или люминисценции [65].

#### *3.1. Методы, основанные на измерении радиоактивности.*

Данные методы основаны на использовании субстратов, меченных  $^3\text{H}$  или  $^{14}\text{C}$ , которые селективно окисляются исследуемыми изоформами P450 [65-67]. После разделения пробы методом ВЭЖХ концентрацию метаболита измеряется с использованием радиохимического детектора. В некоторых случаях в ходе ферментативной реакции происходит высвобождение  $^{14}\text{C}$ -формальдегида, который может быть экстрагирован и измерен при помощи сцинтилляционного счётчика. Существуют версии методик, которые не требуют хроматографического разделения и реализованы в виде содержащих сцинтиллятор шариков, импрегнированных полиэтиленгликолем, которые связывают  $^{14}\text{C}$ -формальдегид. Образование  $^{14}\text{C}$ -формальдегида приводит к возбуждению сцинтиллянта, что вызывает свечение [67]. Данные методы предложены авторами для оценки степени ингибирования цитохромов P450 новыми лекарственными препаратами, их преимуществом является использование любых субстратов, включая эндогенные соединения для оценки активности.

#### *3.2. Биолюминисцентные методы.*

Данная технология основана на использовании субстратов, которые высвобождают люциферин в качестве метаболита (коммерческая разработка фирмы "Promega", США). В ходе инкубации монооксигеназной цитохром P450-содержащей системой с люминогенным субстратом в результате высвобождения люциферина появляется люминисцентное свечение, которое пропорционально активности цитохрома P450. Однако данный метод анализа целесообразно использовать в реконструированных монооксигеназных системах с рекомбинантными или выделенными ферментами, так как субстраты недостаточно изоформспецифичны для использования в препаратах микросом печени [65]. Данный метод анализа применяется в основном при разработке новых лекарственных препаратов для оценки их влияния на активность цитохромов P450.

#### *3.3. Флуоресцентный метод является одним из наиболее распространенных при оценке активности цитохромов P450.*

В основе данного метода лежит использование субстратов, из которых в результате ферментативной реакции с цитохромами P450 образуются флуоресцентные продукты. Изменение интенсивности флуоресценции при инкубировании является мерой количества образовавшегося продукта и,

следовательно, активности фермента. Метод является наиболее простым, экспрессным и хорошо высокопроизводимым, поэтому большинство фармацевтических фирм используют данный подход для определения ингибирования цитохромов P450 новыми лекарственными средствами [65, 68-73]. Специальные наборы для скрининга выпускаются фирмой "BD Bioscience" (США). Однако применение данного метода ограничено низкой изоформспецифичностью используемых субстратов, поэтому его используют в основном для изучения ингибирующего влияния на рекомбинантных ферментах. Так, в работе Yan с соавт. [69] рассмотрено взаимодействие 9 наиболее распространенных субстратов для флуориметрического определения с 29-ю рекомбинантными изоформами цитохрома P450. При ферментативной реакции с CYP 1A1 и 1B1 значения  $K_m$  для бензилового эфира резорфина были сопоставимы, а дибензилфлуоресцеин характеризуется сопоставимыми  $K_m$  для изоформ 1A1 и 3A4. В наборах фирмы BD Bioscience 7-метокси-3-фторкумарин используется для измерения активности CYP 2E1 и 2C9, 3-циано-2-этоксикумарин - CYP 1A2 и 2C19.

*3.4. Методы, основанные на ВЭЖХ с ультрафиолетовым и масс-спектрометрическим детектированием.*

При исследовании цитохромов P450 в биологических объектах, таких как микросомы или срезы тканей, наиболее селективными и точными являются методы, в которых метаболит определяется методом ВЭЖХ. Ранее детектирование осуществлялось при помощи ультрафиолетового детектора, а в настоящее время большее распространение получили методики, основанные на масс-спектрометрическом детектировании [65, 69, 70]. В качестве субстратов ферментативной реакции используют лекарственные вещества, селективно метаболизируемые определенными изоформами цитохрома P450. Изоформспецифичные субстраты дают возможность оценить активность определенных ферментов в сложных системах, таких как микросомы, гепатоциты, клеточные линии и срезы тканей [65, 69, 70].

Определение активности различных изоформ цитохромов P450 осуществляется на основании количества образующегося продукта реакции, при этом для детекции используется в основном масс-спектрометр с тройным квадруполем (QQQ) [74-87]. QQQ состоит из двух квадруполов и находящейся между ними ячейки соударений. Первый квадруполь пропускает только родительские ионы целевого вещества, образующего ячейке соударений характеристические дочерние ионы, на которые настроен второй квадруполь. Наличие двух фильтров позволяет получить селективный сигнал исследуемого вещества и повысить чувствительность определения. Анализ литературных данных о наиболее часто используемых субстратах цитохромов P450 и масс-спектрометрических параметрах, используемых для детектирования суммирован в таблице 3 [74-87].

Например, в статьях [74-82] для исследования активности изоформы 1A2 в качестве субстрата использован фенацетин, а его метаболита - ацетоминофен. После инкубации пробы с фенацетином авторы статей [74-82] проводили анализ методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с ионизацией в электроспрее и масс-спектрометрическим детектированием. Для QQQ в качестве родительского использовали ион  $[M+H]^+$  с  $m/z$  152 Da, соответствующий протонированной форме фенацетина, а в качестве дочернего - фрагмент с  $m/z$  110 Da. Надежность идентификации контролировалась совпадением времени удерживания вещества пробы и стандарта.

#### **4. СОПОСТАВЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОВ P450 С КОЛИЧЕСТВЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ.**

Наиболее интересным с точки зрения создания моделей лекарственного воздействия является сопоставление активности монооксигеназной системы с количественным содержанием фармакологически значимых изоформ цитохромов P450, а также анализ изменения этих параметров под воздействием индукторов и ингибиторов.



Таблица 3. Субстраты, используемые для определения активности фармакологически значимых изоформ цитохромов P450 с хромато-масс-спектрометрическим определением концентрации продукта ферментативного окисления (суммировано по данным работ [74-87]).

Исследуемая изоформа	Маркерный субстрат	Измеряемый метаболит	Родительские и дочерние ионы, используемые для детектирования при помощи QQQ
1A2	Фенацетин	Ацетаминофен	152→10 [74-82]
	Мелатонин	6-гидроксимелатонин	249→190 [83]
	Этоксирезорурфин	Резорурфин	214 [85]
2A6	Кумарин	7-гидроксикумарин	161→133 Neg [75, 80] 163→107 [83 85] 163 [84]
2B6	Бупропион	2-гидроксибупропион	256→139 [74, 80] 256→238 [83, 84] 256→184 [86]
2D6	Декстрометорфан	Декстрорфан	258→201 [74, 79, 82, 87] 258→157 [77, 80, 81] 258→199[83]
	Буфуралол	1-гидроксибуфуралол	278→187 [ 75, 78, 85]
2E1	Хлорзоксазон	6-гидроксихлорзоксазон	184→120 Neg [77, 79, 80, 83]
2C8	Амодиахин	Дезэтиламодиахин	328→283 [74, 80, 83, 86]
	Пакситаксель	6α-гидрокси пакситаксель	870→286 [85]
2C9	Диклофенак	4-гидроксидиклофенак	312→231 [71, 75, 77, 85] 312→266 [76, 81] 310→266 Neg [83]
	Толбутамид	4-гидрокси толбутамид	287→188 [74, 82] 287→89 [78] 287→171 [80, 83] 285→186 Neg [79]
2C19	S-мефенитоин	4-гидрокси мефенитоин	235→186 [75] 235→150 [76, 77, 81, 82, 85] 235→133 [79] 233→190 Neg [80]
	Омепразол	5-гидрокси омепразол	362→214 [74, 78, 83]
	Омепразол	Дезметиломепразол	332→198 [83, 84]
3A4,5	Мидазолам	1-гидроксимидазолам	342→324 [75, 80, 83, 85, 87] 342→203 [71, 76, 77, 79, 86] 342→297 [78] 326→391 [81]
	Тестостерон	6-гидрокси тестостерон	305→287 [74, 82] 305→269 [76, 80, 81, 83]
3A4,5	Омепразол	Омепразол сульфен	362→150 [83, 84]
	Омепразол	3-гидрокси омепразол	362→214 [83, 84]
	Декстрометорфан	3-метоксиморфинан	258→213 [79]
	Фелодипин	Дигидрофелодипин	382→354 [80]

В работе [63] показано сравнение данных количественного хромато-масс-спектрометрического анализа CYP2D6 и результатов определения активности фермента по скорости гидроксилирования декстрометорфана. Исследования выполнены на генотипированной выборке из 30 образцов человеческих микросом, при этом обнаружена корреляция ( $r = 0,8$ ) между активностью и концентрацией CYP2D6. По мнению авторов оценка функциональной активности 2D6 могла быть полезна для предупреждения побочных реакций.

В статье [14] также проведено определение концентраций CYP3A4 и CYP3A5 методами RPLC-ESI-MS/MS и Вестерн блот, а также активности ферментов по отношению к тестостерону (CYP3A), мидазоламу (CYP3A), интроконазолу (CYP3A4) и винкристину (CYP3A5) в образцах микросом печени человека. Показано, что значения скорости гидроксилирования интроконазола, которое осуществляется главным образом CYP3A5, имели коэффициент корреляции 0,97 с концентрацией фермента, определенной масс-спектрометрически. При этом масс-спектрометрические концентрации белков и активности коррелировали между собой (коэффициент корреляции более 0,8) у всех исследованных ферментов, а значения, полученные с использованием иммуноферментных методов, не всегда соответствовали активности и масс-спектрометрическим данным.

Williamson с соавт. [88] осуществили относительный количественный анализ фармакологически значимых изоформ CYP 1A2, 2B6, 3A4 и 3A5 в культуре человеческих гепатоцитов после индукции метилхолантrenom, рифампицином и фенобарбиталом по сравнению с контрольной группой. Анализ выполнен методом MRM в присутствии синтетических изотопно-меченых пептидов, выбранных для каждого белка (по три пептида на белок). Как утверждают авторы, культура человеческих гепатоцитов является ценным модельным объектом при тестировании новых лекарств, поэтому авторы провели сопоставление активности фермента, определенное по скорости реакции со специфичным субстратом, данных анализа мРНК и масс-спектрометрической оценки увеличения содержания белка. Наиболее сильная индукция была отмечена для изоформы CYP 1A2 при обработке культуры человеческих гепатоцитов метилхолантrenom. Интересно также, что для этого белка данные по мРНК показали увеличение в 141 раз, по активности белка увеличение составило 60 раз и по масс-спектрометрическому количественному анализу наблюдали увеличение содержания в 45 раз. Для других изоформ прослеживаются большие корреляции. Например, увеличение содержания CYP 3A4 после индукции фенобарбиталом по масс-спектрометрическим данным составляет 16 раз, активности фермента в 23 раза и мРНК в 14 раз. Полученные данные не удивляют авторов, так как возможное отсутствие корреляций между количеством мРНК и соответствующего белка для цитохромов P450 объясняется пострансляционными и транскрипционными механизмами регуляции содержания белка. Как отмечают авторы, больший интерес вызывают установление взаимосвязей между количественными характеристиками цитохромов P450 и их активностью [88].

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** В настоящее время, несмотря на значительное число работ, посвященное цитохромам P450, разработка эффективных методов их количественного анализа остается актуальной задачей. До сих пор охарактеризованы не все фармакологически значимые изоформы, не достаточно точно определены изменения концентраций CYP при ингибировании или индукции фермента. Так как монооксигеназной системе, и в особенности цитохромам P450 принадлежит ключевая роль в метаболизме ксенобиотиков, исследование взаимодействия нового лекарственного препарата с цитохромами P450, отслеживание возможных ингибирующих и индуцирующих эффектов является необходимой стадией доклинических испытаний. Более того для изучения молекулярных механизмов действия лекарств необходимы исчерпывающие знания о концентрации и активности данных ферментов, а также их изменениях под воздействием различных факторов.

# ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А.И., Лисица А.В., Петушкова Н.А., Карузина И.И. (2008) Клиническая медицина, **86**(2), 4-8.
2. Арчаков А.И. (1975) Монооксигеназное окисление, Наука, М.
3. Nelson D.R. (2011) Biochem. Biophys. Acta, **1814**, 14-18.
4. Кулес В.Г., Грачев С.И., Сычев Д.А., Раменская Г.В. (2008) Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины, ГЭОТАР-Медиа, М.
5. Omura T., Sato T. (1964) J. Biol. Chem., **237**, 1375-1376.
6. Peisach J., Stern J.O., Blumberg W.E. (1973) Drug Metab. Dispos., **1**(1), 45-61.
7. Anderson L., Seilhamer J. (1997) Electrophoresis, **18**, 533-537.
8. Raunio H., Hakola J., Hukkanen J., Pelkonen O., Edwards R., Boobis A., Anttila S. (1998) Arch. Toxicol. Suppl., **20**, 465-469.
9. Luss H., Li R.K., Shapiro R.A., Tzeng E., McGowan F.X., Yoneyama T., Hatakeyama K., Geller D.A., Mickle D.A., Simmons R.L., Billiar T.R. (1997) J. Mol. Cell Cardiol., **29**, 1153-1165.
10. Pradet-Balade B., Boulme F., Beug H., Mullner E.W., Garcia-Sanz J.A. (2001) Trends Biochem. Sci., **26**(4), 225-229.
11. Caron E., Rioux N., Olivier N., Lebel-Talbot H., Hamelin B. (2005) J. Biochem. Molecular. Toxicology, **19**, 368-378.
12. Edwards R.J., Boobis A.R., Davis D.S. (2003) Drug Metab. Dispos., **31**, 1470-1480.
13. Kornilayev B.A., Alterman M.A. (2008) Toxicology In Vitro, **22**, 779-787.
14. Wang M.Z., Wu J.Q., Dennison J.B., Briges A.S., Hall S.D., Kornbluth S., Tidwell R.R., Smith P.C., Voyksner R.D., Paine M.F., Hall J.E. (2008) Proteomics, **8**, 4186-4196.
15. Walter T., Mann M. (2010) J. Cell Biol., **190**, 491-500.
16. Galeva N., Alterman M. (2002) Proteomics, **2**, 713-722.
17. Petushkova N.A., Kanaeva I.P., Lisitsa A.V., Sheremetyeva G.F., Zgoda V.G., Samenkova N.F., Karuzina I.I., Archakov A.I. (2006) Toxicology In Vitro, **20**, 966-974.
18. Petushkova N.A., Lisitsa A.V. (2012) Methods in molecular biology, **909**, 63-82.
19. Sutton C.W., Sutherland M., Shnyder S., Patterson L.H. (2010) Proteomics, **10**, 327-331.
20. Makino T., Kinoshita J., Arakawa S., Ito K., Ando Y., Yamoto T., Teranishi M., Sanbuissho A., Nakayama H. (2009) J. Toxicol. Sci., **34**, 647-661.
21. Zgoda V.G., Moshkovskii S.A., Ponomarenko E.A., Andreewski T.V., Kopylov A.T., Tikhonova O.V., Melnik S.A., Lisitsa A.V., Archakov A.I. (2009) Proteomics, **9**, 4102-4105.
22. Langenfeld E., Meyer H.E., Marcus K. (2008) Anal. Bioanal. Chem., **392**, 1123-1134.
23. Galeva N., Yakovlev D., Koen Y., Duzhak T., Alterman M. (2003) Drug Metab. Dispos., **31**, 351-355.
24. Roy L., LaBoissiere S., Abdou E., Thibault G., Hamel N., Taheri M., Boismenu D., Lanoix J., Kearney R.E., Paiement J. (2010) Biochim. Biophys. Acta, **1804**, 1869-1881.
25. Dail M.B., Shack A., Chambers J.E., Burgess S.C. (2008) Toxicological Sciences, **106**(2), 556-569.
26. Lee H.J., Kwon M.S., Lee E.Y., Cho S.Y., Paik Y.K. (2008) Proteomics, **8**, 2168-2177.
27. Nisar S., Lane C.S., Wilderspin A.F., Welham K.J., Griffiths W.J., Patterson L.H. (2004) Drug Metab. Dispos., **32**(4), 382-386.
28. Копылов А.Т., Згода В.Г. (2007) Биомед. химия., **53**, 613-643.
29. Bantscheff M., Schirle M., Sweetman G., Rick J., Kuster B. (2007) Anal. Bioanal. Chem., **389**, 1017-1031.

30. Ong S.E., Mann M. (2006) *Nature Protocols*, **1**, 2650-2660.
31. Gerber S.A., Rush J., Stemman O., Kirschner M.W., Gugi S.P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6940-6945.
32. Ong S.E., Kratchmarova I., Mann M. (2003) *J. Proteome Res.*, **2**(2), 173-181.
33. Ong S.E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D.B., Steen H., Pandey A., Mann M. (2002) *Mol. Cell. Proteomics*, **1**, 376-386.
34. Everley P.A., Krijgsveld J., Zetter B.R., Gygi S.P. (2004) *Mol. Cell Proteomics*, **3**, 729-735.
35. Jia N., Liu X., Wen J., Qian L., Qian X., Wu L., Fan G. (2007) *Toxicology*, **237**, 1-11.
36. Ji C., Zhang N., Damaraju S., Damaraju V., Carpenter P., Cass C.E., Li L. (2007) *Anal. Chim. Acta*, **585**(2), 219-226.
37. Ji C., Guo N., Li L. (2005) *J. Proteome Res.*, **4**, 2099-2108.
38. Simons B.L., Wang G., Shen R.F., Knepper M.A. (2006) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 2463-2477.
39. Hsu J.L., Huang S.Y., Chow N.H., Chen S.H. (2003) *Anal. Chem.*, **75**, 6843-6852.
40. Gygi S.P., Rist B., Griffin T.J., Eng J. (2002) *J. Proteome Res.*, **1**(1), 47-54.
41. Gygi S.P., Rist B., Gerber S.A., Turecek F., Gelb M.H., Aebersold R. (1999) *Nat. Biotechnol.*, **17**, 994-999.
42. Jenkins R.E., Kitteringham N.R., Hunter C.L., Webb S., Hunt T.J., Elsbey R., Watson R.B., Williams D., Pennington S., Park B.K. (2006) *Proteomics*, **6**, 1934-1947.
43. Schmidt A., Kellermann J., Lottspeich F. (2005) *Proteomics*, **5**(1), 4-15.
44. Ross P.L., Huang Y.N., Marchese J.N., Williamson B., Parker K., Hattan S., Khainovski N., Pillai S., Dey S., Daniels S., Purkayastha S., Juhasz P., Martin S., Bartlett-Jones M., He F., Jacobson A., Pappin D.J. (2004) *Mol. Cell Proteomics*, **3**, 1154-1169.
45. Griffin T.J., Xie H., Bandhakavi S., Popko J. Mohan A., Carlis J.V., Higgins L. (2007) *J. Proteome Res.*, **6**, 4200-4209.
46. Wiese S., Reidegeld K.A., Meyer H.E., Warscheid B. (2007) *Proteomics*, **7**(3), 340-350.
47. Heller M., Mattou H., Menzel C., Yao X. (2003) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **14**(7), 704-718.
48. Fenselau C., Yao X. (2007) *Methods Mol. Biol.*, **359**, 135-142.
49. Ramos-Fernandez A., Lopez-Ferrer D., Vazquez J. (2007) *Mol. Cell Proteomics*, **6**, 1274-1286.
50. Lopez-Ferrer D., Ramos-Fernandez A., Martinez-Bartolome S., Garcia-Ruiz P. (2006) *Proteomics*, **6**(1), 4-11.
51. Beynon R.J., Doherty M.K., Pratt J.M., Gaskell S.J. (2005) *Nature Methods*, **2**, 587-589.
52. Pratt J.M., Simpson D.M., Doherty M.K., Rivers J., Gaskell S.J., Beynon R.J. (2006) *Nature Protocols*, **1**, 1029-1043.
53. Rivers J., Simpson D.M., Robertson D.H., Gaskell S.J. (2007) *Mol. Cell Proteomics*, **6**, 1416-1427.
54. Brun V., Dupuis A., Adrait A., Marcellin M. (2007) *Mol. Cell Proteomics*, **6**, 2139-2149.
55. Yu A.M., Qu J., Felmlee M.A., Cao J., Jiang X.L. (2009) *Drug Metab. Dispos.*, **37**(1), 170-177.
56. Alterman M.A., Kornilayev B., Duzhak T., Yakovlev D. (2005) *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 1399-1407.
57. Duan X., Chen X., Yang Y., Zhong D. (2007) *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, **21**, 3234-3244.
58. Seibert C., Davidson B.R., Fuller B.J., Patterson L.H., Griffiths W.J., Wang Y. (2009) *J. Proteome Res.*, **8**, 1672-1681.
59. Huang J.H., Tsai M.L., Chen Y.W., Chen S.H. (2001) *J. Proteomics*, **74**, 2734-2744.



60. Wang D., Zhang M. (2007) J. Chrom. B, **855**, 290-294.
61. Lane C., Wang Y., Betts R. (2007) Mol. Cell Proteomics, **6**, 953-962.
62. Wang Y., Al-Gazzar A., Seibert C., Sharif A., Lane C., Griffiths W.J. (2006) Biochem. Soc. Trans., **34**, 1246-1251.
63. Langenfeld E., Zanger U.M., Jung K., Meyer H.E., Marcus K. (2009) Proteomics, **9**, 2313-2323.
64. Kawakami H., Ohtsuki S., Kamiie J., Suzuki T., Abe T., Terasaki T. (2011) J. Pharm. Sci., **100**(1), 341-352.
65. Zlokarnic G., Grootenhuis P., Watson J. (2005) Drug discovery today, **10**, 14440-14450.
66. Rodrigues A.D., Kukulka M.J., Surber B.W., Thomas S.B., Uchic J.T., Rotert G.A., Michel G., Thome-Kromer B., Machinist J.M. (1994) Anal. Biochem., **219**, 309-320.
67. Delaporte E., Slaughter D.E., Egan M.A., Gatto G.J., Santos A., Shelley J., Price E., Howells L., Dean D.C., Rodrigues A.D. (2001) J. Biomol. Screen., **6**(4), 225-231.
68. Phillips I., Shephard E. (2006) Cytochrome P450 Protocols, USA, Totowa, New Jersey, Humana Press Inc.
69. Yan Z., Caldwell G. (2007) Methods in Pharmacology and Toxicology. Optimization in Drug Discovery: *In Vitro* Methods, USA, Totowa, NJ, Humana Press Inc.
70. Stresser D.M., Turner S.D., Blanchard A.P., Miller V.P., Crespi L. (2002) Drug Metab. Dispos., **30**, 845-852.
71. Di L., Kerns E.H., Li S., Carter G.T. (2007) Intern. J. Pharm., **335**, 1-11.
72. Петушкова Н.А., Лисица А.В., Позднев В.Ф., Карузина И.И. (2010) Биомед. химия, **56**, 132-137.
73. Donato M.T., Jimenes N., Castell J., Gomez-Lechon J. (2004) Drug Metab. Dispos., **32**(7), 699-706.
74. Dixit V., Hariparsad N., Desai P., Unadkat J. (2007) Biopharm. Drug Dispos., **28**, 257-262.
75. Lahos A., Donato L., Gomez-Lechon J., Castell J. (2007) Toxicology *In Vitro*, **21**, 1247-1252.
76. Lin T., Pan K., Mordenti J., Pan L. (2007) J. Pharm. Sci., **96**(9), 2485-2493.
77. Smith D., Sadagopan N., Zientek M., Reddy A., Cohen L. (2007) J. Chrom. B., **850**, 455-463.
78. Testino S.A., Patoney G. (2003) J. Pharm. and Biomed. Anal., **30**, 1459-1467.
79. Li X., Chen X., Li Q., Wang L., Zhong D. (2007) J. Chrom. B., **852**, 128-137.
80. Walsky R., Obach R. (2004) Drug Metab. Dispos., **32**(6), 23-29.
81. Yao M., Zhu M., Sinz M., Zhang H., Humphreys W. (2007) J. Pharm. Biomed. Anal., **44**, 211-223.
82. Zhang T., Zhu Y., Gunaratna C. (2002) J. Chrom. B., **789**, 371-379.
83. Tolonen A., Turpeinen M., Petsalo A., Uusitalo J., Pelkonen O. (2007) J. Mass Spectrom., **42**, 960-966.
84. Turpeinen M., Uusitalo J., Jorma J., Pelkonen O. (2005) Eur. J. Pharmac. Sci., **24**, 123-132.
85. Dierks E., Stams K., Lim H.-K., Cornelius G., Zhang H., Ball S. (2001) Drug Metab. Dispos., **29**, 23-29.
86. O'Donnell C., Grime K., Courtney P., Slee D., Riley R.J. (2007) Drug Metab. Dispos., **35**(3), 381-385.
87. Bhoopathy S., Xin B., Unger S.E., Karnes H.T. (2005) J. Pharm. Biomed. Anal., **37**, 739-749.
88. Williamson B.L., Purkayastha S., Hunter C.L., Nuwaysir L., Hill J., Easterwood L., Hill J. (2011) Proteomics, **11**, 33-41.

Поступила: 01. 10. 2012.

CURRENT METHODS OF CYTOCHROME P450 ANALYSIS

*N.E. Moskaleva, V.G. Zgoda*

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of Russian Academy of Medical Sciences,  
ul. Pogodinskaya, 10, Moscow, 119121 Russia; e-mail: nemoskaleva@gmail.com

Current review describes recent approaches of cytochrome P450 concentration and activity evaluation. Special attention paid to modern methods of proteomic analysis such as electrophoresis and chromato-mass-spectrometry. Methods of targeted proteomic applicable for quantitative and qualitative study of P450s in biological samples as well as methods for the enzyme activity measurements are reviewed. Finally, data on correlation between certain P450 isoform content and its specific enzymatic activities were described and discussed in the review.

**Key words:** quantitative proteomics, mass-spectrometry, cytochrome P450.