

©Коллектив авторов

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЦИТОХРОМА P450

А.В. Кузиков^{1,2}, Р.А. Масамрех^{1,2}, А.И. Арчаков^{1,2}, В.В. Шумянцева^{1,2}*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ),
119121, Москва, Погодинская ул., д. 10; эл. почта: v_shumyantseva@mail.ru

²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва

Обзор посвящен современным методам определения функциональной активности изоферментов цитохрома P450, таким как абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия, электронный парамагнитный резонанс (ЭПР), ядерный магнитный резонанс (ЯМР), спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия), мёссбауэровская спектроскопия, рентгеновская спектроскопия, метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR), атомно-силовая микроскопия (AFM). Методы молекулярно-генетического анализа проанализированы с позиций персонализированной медицины. Обсуждены возможности хромато-масс-спектрометрических методов для анализа продуктов цитохром P450-зависимых каталитических реакций. В обзоре рассмотрены современные электрохимические системы на основе изоферментов цитохрома P450 для анализа их каталитической активности, обсуждаются практическое применение и дальнейшие перспективы их развития для экспериментальной фармакологии, биотехнологии, трансляционной медицины.

Ключевые слова: цитохром P450, субстраты, ингибиторы, катализ, электрохимический анализ, спектроскопия, масс-спектрометрия

DOI: 10.18097/PBMC20186402149

ВВЕДЕНИЕ

Цитохромы P450 – гем-тиолатные монооксигеназы, участвующие в 90% реакций I фазы биотрансформации ксенобиотиков, в том числе и 75% лекарственных препаратов, а также в метаболизме эндогенных соединений, таких как холестерин, стероидные гормоны, жирные кислоты, эйкозаноиды. Цитохромы P450 являются молекулярными мишенями при разработке лекарственных препаратов – регуляторов метаболизма [1-9]. Индивидуальные особенности каталитической активности изоферментов цитохрома P450 являются главной причиной различий в фармакокинетике и реакции на фармакотерапию [10]. Активный метаболизм лекарственных препаратов, катализируемый цитохромами P450, может приводить к лекарственной интерференции и нежелательным побочным эффектам. В связи с функциональной значимостью этого класса гемопротеинов необходимы современные методы определения каталитической активности монооксигеназной системы и, в частности, индивидуальных форм цитохромов P450. Особенностью цитохромов P450 является необходимость образования белок-белковых комплексов с белками-партнерами (NADPH-зависимая цитохром P450 редуктаза, цитохром *b*₅, аденодоксин, флаводоксин) для проявления каталитической активности. Цитохромы P450 обладают уникальными физико-химическими свойствами, что делает возможным применение для их исследования широкого арсенала высокочувствительных методов аналитической биохимии. Выявление особенностей функционирования отдельных изоферментов цитохрома P450 и их каталитических параметров, изучение механизма межлекарственных

взаимодействий, выявление новых субстратов и ингибиторов цитохрома P450 является актуальной и быстроразвивающейся областью биомедицины.

1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЦИТОХРОМА P450 С ПОМОЩЬЮ РЕКОНСТРУИРОВАННЫХ СИСТЕМ

Цитохромы P450, открытые в 1958 году Гарфинкелем (D. Garfinkel) и Клингенбергом (M. Klingenberg), а также Омуре (T. Omura) и Сато (R. Sato) в 1962 г., получили свое название от слова “pigment” и длины волны максимума поглощения восстановленной формы белка в комплексе с оксидом углерода (II) при 450 нм – P450 [11-14]. Простетической группой цитохрома P450 является гем типа *b*, проксимальным лигандом иона железа которого является не азот имидазольного радикала остатка гистидина, как в случае с миоглобином и гемоглобином, а атом серы цистеинового остатка (Cys), шестым лигандом в отсутствие субстратов или ингибиторов – вода [1, 15]. Монооксигеназная система состоит из белков-партнеров цитохрома P450: флавопротеина NADPH-зависимой цитохром P450 редуктазы (CPR) и цитохрома *b*₅ [16]. Специфическое взаимодействие простетической группы с апоферментом характеризует спектральные, магнитные, химические и функциональные свойства цитохрома P450 [17].

Цитохром P450-содержащие системы объединены в 10 классов в зависимости от субклеточной локализации и организации электрон-транспортной цепи. Основными являются I и II классы, где NADPH выполняет роль источника электронов

* - адресат для переписки

для инициирования каталитической реакции [18, 19]. Класс I включает митохондриальные и бактериальные цитохром P450-зависимые системы, содержащие железо-серные белки – ферредоксин или адренодоксин – и флавопротеин-редуктазу ферредоксина или адренодоксина в качестве редокс-партнеров цитохрома P450. Семейство CYP11 (изоферменты CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2) является представителем I класса цитохром P450-зависимой системы стероидогенеза, локализованной в мембране митохондрий клеток коры надпочечников млекопитающих. К классу II принадлежат изоферменты цитохрома P450 микросомальной монооксигеназной системы, локализованной в мембране эндоплазматического ретикула клетки и содержащей в качестве редокс-партнера флавопротеин цитохром P450 редуктазу (CPR). Для функционирования некоторых микросомальных изоферментов цитохрома P450 необходимо участие гемопroteина цитохрома b_5 (cyt b_5) [20]. Каталитический цикл цитохрома P450 представлен на рисунке 1. Первая стадия каталитического цикла характеризуется присоединением субстрата в активный центр низкоспиновой ферри-формы фермента (1 на рис. 1), ион железа гема которой в отсутствие субстрата связан с шестым лигандом – молекулой воды. При связывании цитохрома P450 с субстратом ион железа смещается из плоскости порфиринового кольца в направлении пятого лиганда – атома серы цистеинового остатка, это приводит

к вытеснению воды из координационной сферы иона железа (2 на рис. 1) – образуется комплекс ферри-формы фермента с субстратом. Связывание субстрата индуцирует переход иона железа гема из низкоспинового состояния в высокоспиновое, это, в свою очередь, вызывает смещение редокс-потенциала в более положительную область и облегчает восстановление иона железа гема электроном от CPR (или ферредоксина/адренодоксина) (3 на рис. 1), в результате формируется комплекс ферро-формы фермента с субстратом. Ион железа гема цитохрома P450 в восстановленном состоянии имеет высокое сродство к кислороду, являющегося косубстратом фермента. Связывание кислорода ионом восстановленного железа гема приводит к образованию ферро-окси-формы фермента, находящейся в равновесии с ферри-супероксид-формой, содержащей неспаренный электрон на дистальном атоме кислорода (4 на рис. 1). Автокаталитический распад комплекса ферри-супероксид-формы фермента с субстратом приводит к образованию супероксидного радикала (O_2^-) и окисленной формы цитохрома P450. При продуктивном катализе комплекс ферри-супероксид-формы цитохрома P450 с субстратом восстанавливается вторым электроном, поставляемым от CPR (или cyt b_5 для ряда микросомальных изоферментов цитохрома P450) либо от ферредоксина/адренодоксина, что приводит к образованию ферри-перокси-формы фермента (5a на рис. 1). Последующее протонирование

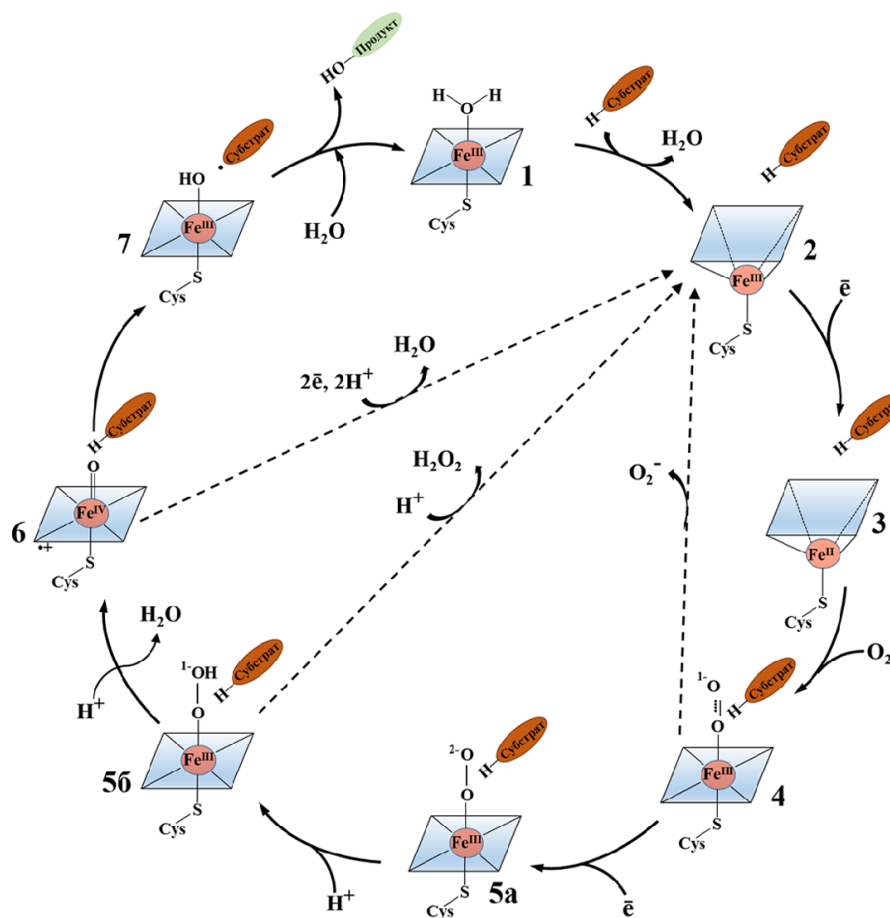


Рисунок 1. Каталитический цикл цитохрома P450. Пояснения в тексте. Адаптировано из [21].

дистального атома кислорода ферри-перокси-формы фермента приводит к образованию ферри-пергидрокси-формы фермента (5б на рис. 1), распад которой сопровождается образованием пероксида водорода (H_2O_2) и окисленной формы цитохрома P450. При протекании продуктивного катализа ферри-пергидрокси-форма фермента протонируется, что облегчает разрыв связи О-О с образованием воды и высоковалентной феррильной формы цитохрома P450 (6 на рис. 1), непосредственно участвующей в окислении субстрата (7 на рис. 1).

Для анализа каталитической активности изоферментов цитохрома P450 в условиях *in vitro* необходимо реконструирование электрон-транспортной цепи с использованием редокс-партнерных белков цитохрома P450, таких как CPR и *cyt b₅* (для ряда изоферментов), а также NADPH, NADPH-регенерирующей системы (например, глюкозо-6-фосфат, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа) и природных фосфолипидов [17], либо их синтетических аналогов [22].

Реконструированные монооксигеназные системы различных изоферментов цитохрома P450 активно используются для проведения скрининга субстратов, ингибиторов этого класса гемопротеинов, для анализа влияния биологически активных соединений на каталитические функции цитохромов P450, лекарственного метаболизма [23]. Использование микросом человека или животных связано с этическими проблемами, поэтому такой подход не является оптимальным для создания тест-систем на основе цитохрома P450. Развитие методов получения рекомбинантных белков, в том числе и белков слияния [24-27], содержащих на одной полипептидной цепи и гемопротеин, и редуктазу, позволяет уменьшить многокомпонентность и, соответственно, упростить такие тест-системы [28, 29].

С целью стандартизации анализа разработаны протоколы исследования каталитической активности изоферментов цитохрома P450 в реконструированных системах, содержащих очищенный гемопротеин, редуктазу, NAD(P)H-регенерирующую систему. Известно, что для реконструкции монооксигеназных систем, содержащих изоферменты цитохрома P450 эукариот, особую роль играют фосфолипиды [23, 30].

Реконструированные системы применялись для поиска ингибиторов CYP2B4 среди веществ – загрязнителей окружающей среды (поллютантов) [31].

Каталитическая активность и субстратная специфичность бактериальных изоферментов цитохрома P450, выделенных из *Streptomyces peucetius* и миксобактерии *Sorangium cellulosum* So ce56, были исследованы с помощью реконструированных систем, что позволило выявить их субстраты и продукты каталитических реакций [32, 33]. Было установлено, что CYP147F1 *Streptomyces peucetius* является гидроксилазой жирных кислот, а CYP260A1 *Sorangium cellulosum* So ce56 – является уникальной монооксигеназой, осуществляющей 1 α -гидроксильрование ряда C19-стероидов.

С помощью реконструированной системы было исследовано влияние полиморфизмов

гена CYP19A1 на активность данного изофермента цитохрома P450 [34]. Выявлено влияние замен аргинина-264 на гистидин или цистеин на активность CYP19A1 и формирование аминокислотной последовательности, распознаваемой различными киназами, изменяющими активность изофермента цитохрома P450. Замена аргинина на гистидин приводит к увеличению константы Михаэлиса в 2,5 раза и снижению каталитической константы в 1,4 раза, а цистеин-264 увеличивает константу Михаэлиса в 1,6 раза, практически не меняя каталитическую константу.

Реконструированная система, состоящая из ароматазы (цитохром P450 19A1, *rArom*), цитохром P450 редуктазы человека, NADPH и андростендиона, была исследована для анализа активности этого гемопротеина в присутствии химических соединений, нарушающих функционирование гормональной системы (endocrine disrupting chemicals (EDCs), таких как бисфенол А, линдан, никотин, диэтиленгликоль, диизодецилфталат, диизононилфталат, триметакрезил фосфат, силденафил, ресвератрол [35]. Авторы показали, что все исследованные соединения в той или иной степени ингибируют активность ароматазы, что необходимо учитывать при проведении комплексной терапии, а также использовании в промышленности соответствующих материалов.

Одной из проблем реконструкции монооксигеназной системы является склонность мембранных изоферментов цитохрома P450 к олигомеризации. Для получения мономерной реконструированной системы применяются мономеризация в присутствии детергентов [1] или использование самоорганизующихся липид-белковых структур, получивших название “нанодиски” [36, 37]. Встраивание в нанодиски позволяет исследовать мембранные белки в водной фазе с сохранением их функциональной активности [36, 37]. Нанодисковые структуры представляют собой фрагмент бислойной мембраны, окруженной скаффолд-белком (*membrane scaffold protein*), например, аполипопротеином А. Использование нанодисков, имитирующих мембранное окружение, вместо детергентов для повышения растворимости при исследовании цитохром P450-содержащих систем позволяет повысить стабильность изоферментов цитохрома P450, снижая скорость их инактивации, сопровождаемой переходом в форму P420 [38]. Кроме того, нанодисковые структуры позволяют использовать оптимальное стехиометрическое соотношение белок/липид, контролировать процесс олигомеризации изоферментов цитохрома P450 [37].

Работы группы Sligar по получению подобных структур с встроенными в них CYP2B4 и CPR [39-41] положили начало исследованиям изоферментов цитохрома P450 с применением данной технологии. Нанодиски со встроенным CYP3A4 были использованы для оценки влияния α -нафтофлавона на активность по отношению к синтетическому флуорогенному субстрату – Нильскому красному [42]. Было выявлено, что α -нафтофлавоны могут выступать аллостерическим регулятором CYP3A4.

С помощью нанодисковых структур, содержащих CYP5A1 (тромбоксансинтазу), были исследованы термодинамические и кинетические параметры, изменения окислительно-восстановительного потенциала при взаимодействии с субстратом и его синтетическими аналогами, а также каталитическая активность фермента в зависимости от липидного состава нанодисковых частиц [43]. Показано, что фосфатидилсерин в составе нанодисков увеличивает каталитическую активность фермента по сравнению с фосфатидилхолином. Нанодисковые структуры, содержащие CYP17A1, CPR и *cyt b₅*, использовались для исследования механизмов формирования интермедиатов каталитического цикла и протекания гидроксилазной и лизазной реакций [44]. Показано, что лизазная реакция протекает по механизму, отличному от механизма гидроксилазной реакции, предположительно без формирования высоковалентной оксо-формы ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) CYP17A1.

Реконструированные системы на сегодняшний день остаются наиболее часто используемыми при исследовании цитохромов P450 (новых изоформ [32, 33], мутантных форм [34], ферментов, полученных генно-инженерными методами [35]). Реконструированные системы не требуют высокотехнологичного и уникального оборудования при анализе каталитических функций этого класса гемопротеинов, за исключением масс-спектрометрической идентификации продуктов катализа. Сложность использования реконструированных систем заключается в выборе сервисных белков-партнеров, если они не идентифицированы, как в случае некоторых бактериальных цитохромов P450 [45].

2. СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОХРОМА P450

Каждая стадия каталитического механизма цитохрома P450 характеризуется специфическими изменениями окислительного статуса гема и его спинового состояния, планарности порфиринового кольца, перераспределением электронов в молекуле кислорода как косубстрата, а также конформационными изменениями апофермента. Эти изменения могут быть зарегистрированы с помощью соответствующих спектральных методов, таких как абсорбционная UV-Vis спектроскопия, ЭПР, ЯМР, рамановская, мёссбауэровская и рентгеновская спектроскопия [37]. Кроме того, оценка функциональной активности фермента может быть произведена методами стационарной и предстационарной кинетики, определением продуктов реакции методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии, хромато-масс-спектрометрическими методами, а также ЯМР для точного определения химической структуры продуктов реакции.

2.1. Абсорбционная спектроскопия

Спектральные исследования цитохромов P450 основаны на наличии характеристической для протетической группы этих гемопротеинов

полосы поглощения световой волны, что делает UV-Vis спектроскопию доминирующей при расчёте концентрации гемопротеина, исследовании физико-химических свойств, изучении взаимодействия с субстратами и ингибиторами, при проведении экспериментов стационарными и предстационарными кинетическими методами [37, 46].

Цитохром P450 характеризуется состоянием спинового равновесия [47, 48], изменение которого обусловлено взаимодействием иона железа гема с лигандами, сопровождающимся переходами между двумя магнитными состояниями ($S=5/2$) и ($S=1/2$). Такие состояния обозначаются как ферри (Fe^{III}) шестикоординационное низкоспиновое (6cLS), без субстрата (SF), пятикоординационное высокоспиновое (5cHS), связанное с субстратом (SB). Спектр поглощения окисленной ферри (Fe^{III}) формы цитохрома P450 характеризуется положением максимума спектральной полосы Core при 415-417 нм. Различные соединения, взаимодействующие с цитохромом P450, могут вызывать сдвиги в дифференциальных спектрах поглощения, что связано с изменением спинового состояния железа гема [17, 46, 49, 50]. Спектральные изменения I типа характеризуются максимумом поглощения при длине волны в области 390 нм и минимумом – 420 нм. Соединения, вызывающие эти изменения, переводят ион железа гема фермента в высокоспиновое состояние, как правило, к этим соединениям относятся субстраты цитохрома P450. Спектральные изменения II типа характеризуются максимумом при длинах волн в области 425-440 нм и минимумом – 390-415 нм. К соединениям, вызывающим спектральные изменения II типа, относятся многие азотсодержащие вещества, способные к координации с ионом железа гема [17]. Ряд соединений вызывает спектральные изменения так называемого “модифицированного II типа”, или “реверсивного I типа”, являющиеся зеркальным отражением спектральных изменений I типа [51]. Способность лиганда вытеснить молекулу воды из координационной сферы иона железа гема выражается в соотношении высоко- и низкоспиновой формы гемопротеина. Абсорбционная спектроскопия используется при скрининге потенциальных субстратов или ингибиторов изоферментов цитохрома P450 [52]. Спектральная константа связывания (K_s) вычисляется из зависимости интенсивности спектральных изменений от концентрации лиганда. Классификация по типу спектральных изменений не может быть универсальной, так как некоторые соединения не вызывают ни I (субстратного), ни II (ингибиторного) типов спектральных изменений [45, 53, 54] или дают спектральные изменения II типа [53, 55], при этом подвергаются биотрансформации в процессе цитохром P450-зависимого катализа. Дезокискортикостерон не вызывает спектральных изменений CYP106A2 *Bacillus megaterium* (штамм ATCC 13368), подвергаясь при этом CYP106A2-зависимому 15-гидроксигированию [53]. Итраконазол вызывает спектральные изменения II типа CYP3A4, но при этом происходит его гидроксигирование [55, 56].

На рисунке 2 представлены спектры поглощения ферри (Fe^{III}) окисленной формы цитохрома P450 (А) и его ферро (Fe^{II}) восстановленной формы в комплексе с оксидом углерода (II) (Б), а также дифференциальные спектры I типа (В) и II типа (Г).

Цитохромы P450 могут быть использованы для исследования комплексообразования с анализируемыми соединениями без белков-партнеров, так как проявляют те же спектральные изменения, что и микросомы. Поэтому реконструирование монооксигеназной системы для выявления соединений, способных к комплексообразованию с активным центром цитохрома P450, с помощью абсорбционной спектроскопии не является необходимым условием, в отличие от определения каталитической активности.

2.2. Флуоресцентная спектроскопия

Флуоресцентный анализ чаще всего применяется для определения каталитической активности изоферментов цитохрома P450 при исследовании их субстрат-ингибиторного потенциала. Анализ образования флуоресцентного продукта позволяет с высокой чувствительностью оценить протекание каталитической реакции. Для ряда изоферментов цитохрома P450 разработано большое количество синтетических флуорогенных субстратов [57],

являющихся производными резорфина [58], 6-гидроксихинолина, флуоресцеина [59], 7-гидроксикумарина [60-62], 4-метилсульфонилфенил фуранона [63]. Принцип метода заключается в регистрации эмиссии флуоресцентного продукта, образующегося в ходе цитохром P450-зависимой каталитической реакции; в присутствии ингибитора интенсивность эмиссии флуоресцентного продукта реакции снижается (рис. 3).

Отсутствие необходимости выделения продуктов цитохром P450-зависимой реакции при использовании флуорогенных субстратов значительно упрощает проведение анализа каталитической активности [57, 64, 65], при этом могут быть использованы как рекомбинантные ферменты, так и микросомы или клеточные культуры [66]. Существуют коммерчески доступные наборы для проведения флуоресцентного анализа активности различных изоферментов цитохрома P450. В таких наборах используются бакулосомы (клетки насекомых, трансфицированные бакуловирусом и экспрессирующие различные изоферменты цитохрома P450), которые содержат определенный изофермент цитохрома P450, NADPH-зависимую цитохром P450 редуктазу (CPR), NADPH-регенерирующую систему, а также сыв. b_5 для ряда изоферментов.

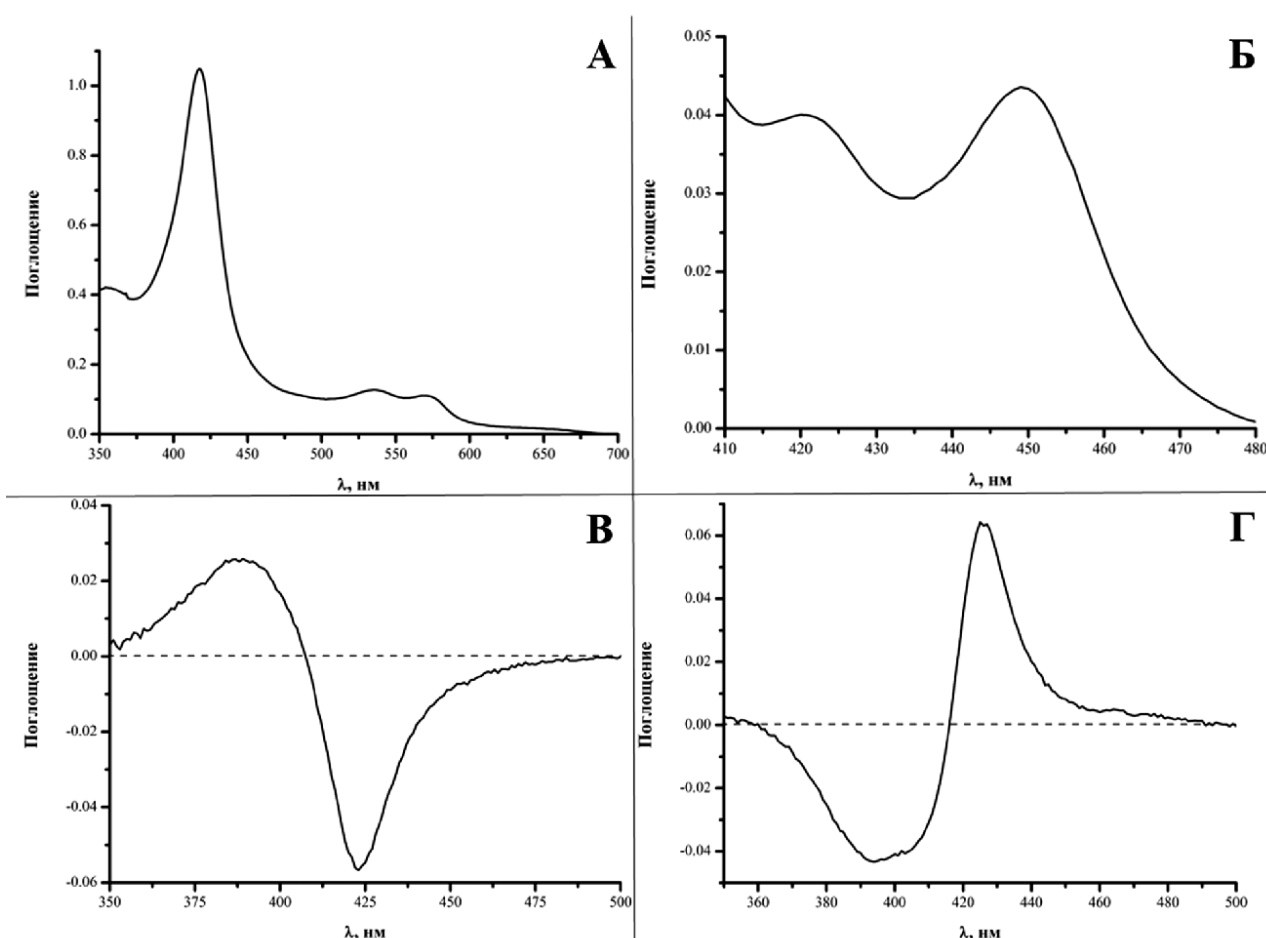


Рисунок 2. Спектры поглощения ферри (Fe^{III}) окисленной формы цитохрома P450 2C9 (А) и его ферро (Fe^{II}) восстановленной формы в комплексе с оксидом углерода (II) (Б), а также дифференциальные спектры I типа (CYP51A1 + Галетерон, В) и II типа (CYP3A4 + Абиратерон, Г). Экспериментальные данные авторов.

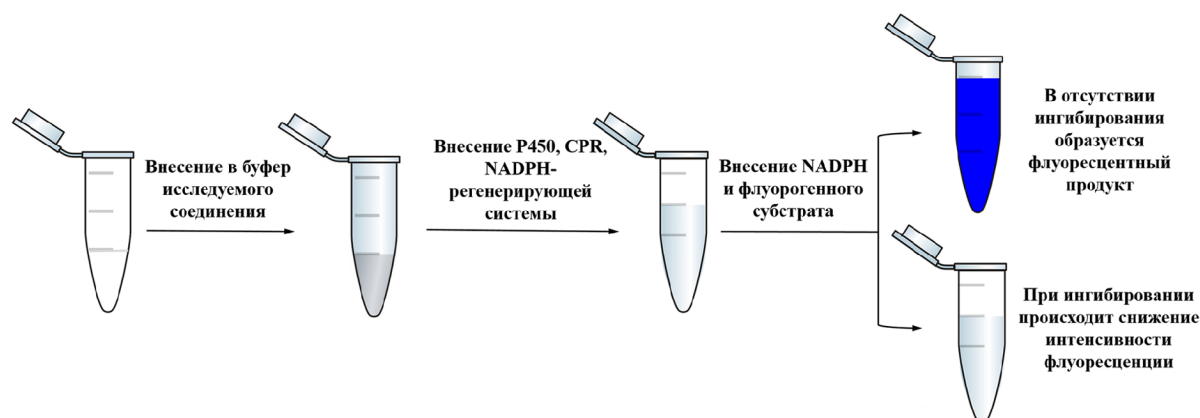


Рисунок 3. Принцип флуоресцентного анализа каталитической активности цитохрома P450.

Несмотря на то, что на сегодняшний день разработаны достаточно селективные синтетические флуорогенные субстраты, которые эффективно трансформируются в флуоресцентный продукт индивидуальными изоферментами цитохрома P450, стоит отметить, что не для всех изоферментов разработаны подобные субстраты. Для стероид-метаболизирующих изоферментов цитохрома P450, активно исследуемых в связи с высокой функциональной значимостью при поиске противораковых препаратов, флуорогенные субстраты не разработаны. Это связано с субстратной специфичностью этих изоферментов, ограничивающей использование флуоресцентного анализа каталитической активности стероид-метаболизирующих изоферментов цитохрома P450 при проведении скрининга потенциальных ингибиторов.

2.3. Электронный парамагнитный резонанс

В аэробных условиях ион железа гема цитохрома P450 находится в окисленном состоянии (Fe^{III}) с пятью электронами на $3d$ -энергетическом уровне. Без субстратов или ингибиторов шестым лигандом иона железа гема является вода, а пятым – атом серы цистеинового остатка апофермента. При этом ион железа находится в низкоспиновом состоянии ($S=1/2$). Связывание гидрофобных субстратов в активном центре цитохрома P450 приводит к вытеснению молекулы воды и переводит ион железа из низкоспинового ($S=1/2$) (характеризуется значениями g -факторов примерно [$g_1=2,45$, $g_2=2,26$, $g_3=1,91$]) в высокоспиновое ($S=5/2$) (характеризуется значением g -факторов примерно [$g_1=8$, $g_2=4$, $g_3=1,7$]) состояние. Диаметр иона железа в высокоспиновом состоянии становится больше, что способствует вытеснению его из плоскости порфиринового кольца [67]. Метод ЭПР был использован для исследования образования пероксо- и гидропероксо- интермедиатов цитохрома P450 101A1 и его мутантных форм [68]. С помощью метода ЭПР исследованы механизмы кооперативного взаимодействия, определены участки связывания различных лигандов с CYP101A1 и CYP3A4 [69–71]. ЭПР спектроскопия с целью исследования спинового состояния цитохрома P450 проводится с использованием гелиевых криостатов при температуре около 77 K или ниже (часто при 12–15 K), поэтому полученные

данные могут не отражать реального спинового состояния, которое зависит в том числе и от температуры, но ЭПР спектроскопия является ценным инструментом для исследования нестабильных короткоживущих интермедиатов сложного и многостадийного каталитического цикла цитохрома P450.

2.4. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР спектроскопия) используется при установлении химической структуры продуктов цитохром P450-зависимых каталитических реакций. Кроме того, ЯМР используется для изучения связывания субстратов с активным центром цитохрома P450, а также для исследования белок-белковых взаимодействий [46]. Метод позволяет устанавливать конформационные изменения, которые вызывают субстраты, ингибиторы и другие эффекторные молекулы [72]. В одной из первых работ по изучению влияния структуры на функцию цитохрома P450 с помощью ЯМР была исследована парамагнитно-индуцированная спиновая релаксация воды и лауриновой кислоты (субстрата) в активном центре CYP102A1 в ответ на восстановление фермента [73]. Полученные данные были использованы для создания моделей связывания лауриновой кислоты с CYP102A1 в окисленной (Fe^{III}) и восстановленной (Fe^{II}) форме. Были исследованы взаимодействия между субстратами и гемами CYP1A1, CYP2B1 [74], CYP3A4 [75], CYP2C9 [76] и CYP2B4 [77]. С помощью метода ЯМР было выявлено одновременное связывание мидазолама и других субстратов (тестостерона и α -нафтофлавона) с активным центром CYP3A4, при этом авторы заключили, что такое взаимодействие может изменять метаболизм мидазолама [75].

При исследовании мембранных форм цитохрома P450 ЯМР не позволяет достоверно оценить конформационные изменения, происходящие при связывании эффекторных молекул и субстратов в природных системах, поскольку данный метод требует использования белков в растворе, не содержащем липиды [78], или изотопного обогащения изофермента цитохрома P450 или его субстрата, что является серьезным ограничением данного метода, однако использование нанодисковых структур, упомянутых выше (см. разд. 1), позволяет решать эту проблему [79].

2.5. Рамановская спектроскопия

(спектроскопия комбинационного рассеяния)

Как правило, при рассеянии света его частота не меняется (упругое рассеяние); однако, небольшая часть излучения рассеивается неупруго с изменением частоты – этот эффект называется рассеянием Рамана [80]. Причиной изменения частоты является либо возбуждение на более высокий колебательный уровень, либо добавление к электромагнитной энергии световой волны колебательной энергии молекулы [80]. Основным преимуществом метода рамановской спектроскопии является возможность изучения колебательных переходов отдельных хромофорных групп сложной молекулы, например, за счёт облучения образца светом с длиной волны в видимом диапазоне спектра (как правило, в полосе Соре), при этом происходит возбуждение молекулярных колебаний за счёт энергии рассеивающихся фотонов, что приводит к появлению в спектре рассеянного света дополнительных полос с меньшими, а также большими (в случае анти-Стоксова рассеяния) частотами [21]. В цитохроме P450 такими хромофорными группами являются прежде всего порфирин и железо-аксиальный лиганд [46]. При взаимодействии изоферментов цитохрома P450 с субстратами [21, 81, 82], ингибиторами [83] и другими лигандами, такими как NO [84], CN⁻ [85], наблюдаются изменения характеристического рамановского спектра (волнового числа и/или интенсивности), отражающие конформационные перестройки в молекуле. Рамановская спектроскопия применялась для исследования структурных изменений CYP3A4, встроенного в нанодисковые структуры, при взаимодействии с субстратами, CO и O₂ [86]. С помощью рамановской спектроскопии были зарегистрированы спектральные изменения CYP102A1 мутантных форм по Phe393 в ответ на восстановление иона железа гема или связывание с субстратом, которые объяснялись различиями в конформационных изменениях винильных или пропионильных групп порфирина, соответственно [81].

Метод рамановской спектроскопии применяется при исследовании конформационных изменений, вызванных взаимодействием изоферментов цитохрома P450 с лигандами, или восстановлением иона железа гема, при исследовании интермедиатов каталитического цикла. Метод рамановской спектроскопии применялся для изучения ключевых интермедиатов каталитического цикла 17 α -гидроксилазы, 17(20)-лиазы (CYP17A1), участвующих в лиазной реакции по отношению к 17 α -гидроксипрегненолону. Авторы предполагают, что ключевую роль в механизме лиазной реакции играет пероксо-интермедиат, связанный с 17 α -гидроксипрегненолоном, атакующий электрофильный 20 углеродный атом субстрата. Авторам удалось идентифицировать ранее предполагаемое пероксо-гемиацетальное производное, являющееся продуктом данной реакции [87].

2.6. Мёссбауэровская спектроскопия

Эффект Мёссбауэра заключается в испускании и поглощении квантов электромагнитной энергии (гамма-квантов) ядрами в твердом теле без потери энергии на отдачу. Исследуемое вещество (поглотитель) облучается γ -квантами, излучаемыми мёссбауэровскими изотопами, например, ⁵⁷Fe, при этом поглотитель должен содержать такие же изотопы. Те γ -кванты, энергия которых совпадает с разностью энергий возбужденного и основного состояний ядер поглотителя, возбуждают ядро, поглощаясь при этом, и не попадают на детектор, в то время как кванты других частот проходят через поглотитель свободно и регистрируются детектором [88]. Мёссбауэровская спектроскопия (метод ядерного гамма-резонанса) – точный метод, позволяющий охарактеризовать электронную структуру железа гема во всех возможных степенях окисления. С помощью мёссбауэровской спектроскопии проводятся измерения электрических и магнитных взаимодействий ядра атома железа с его окружением, а также анализируются спиновое состояние и степень окисления мёссбауэровского изотопа и его структурные параметры [21]. В пионерской работе [89] по исследованию CYP101A1 с помощью мёссбауэровской спектроскопии были определены параметры свободной и связанной с субстратом форм фермента. Дальнейшее исследование [90] позволило выяснить, что нативный, свободный от субстрата, цитохром P450 содержал ион железа в низкоспиновом состоянии, часть которого (50-70%) переходила в высокоспиновое при взаимодействии с субстратом (камфорой), тогда как 2-фенилимидазол мало изменял мёссбауэровский спектр. Добавление путидаредоксина (PD) к комплексу окисленного CYP101A1 с камфорой вызывало снижение интенсивности высокоспиновой компоненты и изменения в квадрупольном расщеплении. Эти данные позволили сделать вывод о том, что CYP101A1 и его комплексы являются аналогами соответствующих комплексов гемоглобина. Мёссбауэровская спектроскопия имеет ряд ограничений, основными из которых являются включение ⁵⁷Fe в гем цитохрома P450, использование большого количества биоматериала, а также проведение эксперимента при температуре, не выше 4,2 К [21, 91].

2.7. Метод рентгеноструктурного анализа и рентгеновская спектроскопия

Метод рентгеноструктурного анализа является инструментом для исследования белков в кристаллическом состоянии и позволяет получать важную информацию о взаиморасположении атомов в пространстве, организации активного и регуляторных центров фермента, что необходимо при молекулярном моделировании взаимодействий изоферментов цитохрома P450 с лигандами, в том числе при разработке и исследовании лекарственных препаратов [92-94]. Метод рентгеноструктурного анализа является доминирующим для исследования трёхмерной структуры изоферментов цитохрома P450.

Метод рентгеновской спектроскопии, в частности спектроскопия протяженной тонкой структуры рентгеновского поглощения (EXAFS), позволяет определять с высокой точностью длину связи металла с лигандом, а также идентифицировать координационные атомы и их количество в металлоферментах [21, 95]. С помощью данного метода было подтверждено наличие атома серы как аксиального лиганда иона железа гема цитохрома P450 101A1 (CYP101A1), метаболизирующего камфору [96]. Одной из разновидностей рентгеновской спектроскопии, позволяющей определять угол связи в комплексе Fe-O-O, изменения геометрии и электронной структуры координационной сферы железа гема, является XANES – исследование ближней тонкой структуры рентгеновского поглощения [97]. Рентгеновская спектроскопия с достаточной точностью позволяет определять микроокружение иона железа гема цитохрома P450 и его изменения, связанные с фермент-субстратными (лигандными) взаимодействиями [98].

Таким образом, методы рентгеноструктурного анализа и рентгеновской спектроскопии позволяют устанавливать структурные аспекты катализа.

3. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ / ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Хромато-масс-спектрометрические методы являются стандартными в аналитической химии и широко применяются для идентификации и количественной оценки продуктов каталитических реакций цитохромов P450, а также для качественного и количественного протеомного анализа изоферментов цитохрома P450 в биологических образцах, таких как микросомы, срезы тканей, отдельные органы [99-113]. При проведении анализа каталитической активности изоферментов цитохрома P450 с использованием хромато-масс-спектрометрических методов для определения продуктов реакции могут быть использованы микросомальные и реконструированные монооксигеназные системы [114]. С целью количественного анализа продуктов реакций осуществляют хроматографическое разделение (например, ВЭЖХ) исследуемых образцов с последующей масс-спектрометрической идентификацией элюентов. Таким образом, можно с высокой точностью идентифицировать продукты каталитической реакции путём соотнесения времени удержания индивидуального соединения на хроматографической колонке с его величиной m/z . Благодаря масс-спектрометрическому подходу можно идентифицировать вещества, которые относительно мало или вовсе не поглощают в ультрафиолетовом диапазоне спектра. Кроме того, некоторые соединения имеют близкие значения длин волн максимумов поглощения. Например, метаболиты CYP17A1 имеют максимум поглощения в ультрафиолетовой области, однако, 3 β -гидрокси-стероиды имеют сравнительно меньшую интенсивность поглощения, чем 3-кето-стероиды, при данной длине волны, поэтому для их идентификации с помощью УФ-детектора применяют различные методы

дериватизации, в том числе получение 3-кето-стероидных производных [115]. Использование в данном случае масс-спектрометрического подхода значительно упрощает задачу, однако обращает на себя внимание тот факт, что данные соединения после ионизации имеют различную стабильность [116].

Хромато-масс-спектрометрический анализ является ценным инструментом при исследовании вновь открываемых изоферментов цитохрома P450 и их субстратной специфичности, поскольку позволяет идентифицировать продукты каталитической реакции. Исследование метаболизма CYP260A1 миксобактерии *Sorangium cellulosum* So ce56 позволил выявить ряд субстратов, принадлежащих C19-ряду стероидов, метаболизм которых был исследован с помощью реконструированных систем. Путём соотнесения времени удержания соединения на хроматографической колонке с его величиной m/z идентифицированы продукты гидроксилазной активности фермента, а также выявлены продукты неферментативной конверсии гидроксированных C19-стероидов [33].

Таким образом, хромато-масс-спектрометрические методы нашли своё достойное место в анализе продуктов каталитических реакций цитохромов P450, а также для качественного и количественного протеомного анализа изоферментов цитохрома P450 в биологических образцах.

4. МЕТОД ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

Оптический биосенсор, принцип действия которого основан на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance, SPR), – высокоэффективный прибор, который позволяет осуществлять прямую регистрацию межмолекулярных взаимодействий в реальном времени без дополнительного использования каких-либо меток или сопряженных процессов [117]. На рисунке 4 представлен принцип работы оптического биосенсора.

Если на поверхность раздела фаз падает луч света, может наблюдаться полное внутреннее отражение падающего луча, после модификации тонким слоем золота такой поверхности фотоны взаимодействуют со свободными электронами в металле, образуя плазмоны, представляющие собой квантовую коллективную осцилляцию электронов у поверхности материала, выражающуюся в возникновении флуктуаций плотности заряда [118, 119]. Анализ взаимодействий низкомолекулярных соединений с изоферментами цитохрома P450 и белок-белковых взаимодействий в цитохром P450-содержащих системах, определение кинетических и термодинамических параметров комплексообразования могут проводиться с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса. Сочетание методов плазмонного резонанса и абсорбционной спектроскопии было использовано для скрининга лигандов CYP51A1 (стероид 14 α -деметилазы) среди стероидных и терпеновых соединений растительного и животного происхождения,

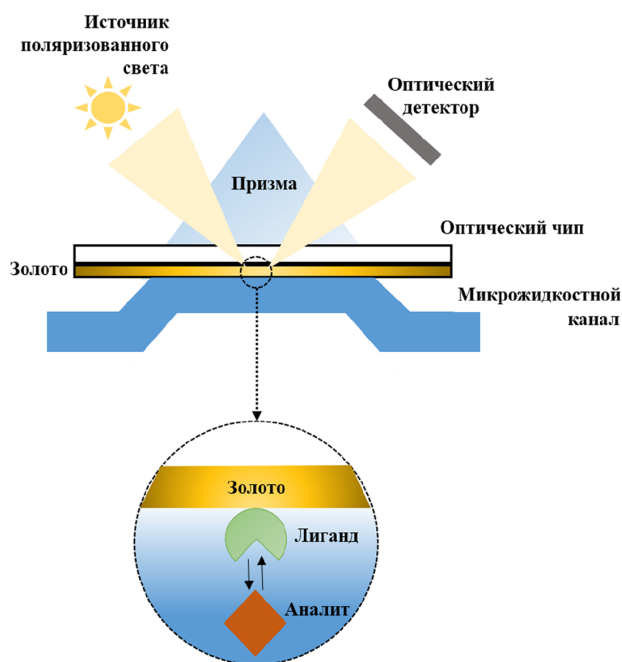


Рисунок 4. Принцип работы оптического биосенсора - регистрация массопереноса аналита между объемом и зоной регистрации SPR у поверхности оптического чипа с иммобилизованным лигандом. Рисунок взят с небольшими изменениями из [117] с разрешения редакции журнала “Биомедицинская химия”.

которые могут быть использованы в качестве гипохолестеринемических лекарственных соединений [120]. С помощью метода поверхностного плазмонного резонанса было исследовано взаимодействие различных изоферментов цитохрома P450 как с микросомальной, так и с митохондриальной формой цитохрома b_5 (cyt b_5) [121]. Проведенный анализ позволил выявить существование двух групп комплексов цитохрома b_5 с изоферментами цитохрома P450: энтальпийно-зависимые (CYP3A4, CYP3A5 и CYP17A1 с обеими формами cyt b_5), формирующиеся преимущественно за счёт образования электростатических и водородных связей, для которых $\Delta H < 0$, $-T\Delta S > 0$, энтропийно-зависимые (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP1B1 и CYP51A1 с обеими формами cyt b_5), формирующиеся преимущественно за счёт гидрофобных взаимодействий, для которых $\Delta H > 0$ и $-T\Delta S < 0$. Авторы заключили, что cyt b_5 , образуя энтальпийно-зависимые комплексы с цитохромами P450, выступает в роли аллостерического регулятора, а при образовании энтропийно-зависимых комплексов cyt b_5 не оказывает влияния на активность соответствующих изоферментов цитохрома P450.

Таким образом, метод поверхностного плазмонного резонанса является современным аналитическим инструментом для исследования кинетических и термодинамических параметров как фермент-лигандных взаимодействий изоферментов цитохрома P450 с низкомолекулярными соединениями, так и белок-белковых взаимодействий с редокс-партнёрами. Метод применяется для выявления и исследования взаимодействий как между отдельными белками, так и в различных

биообразцах, таких как клеточный лизат [122]. Стоит отметить, SPR-биосенсоры являются дорогостоящими приборами, и поэтому такие исследования могут проводиться только в научно-исследовательских институтах, в первую очередь из-за относительно высокой стоимости оборудования и расходных материалов (модифицированных чипов).

5. МЕТОД АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Метод атомно-силовой микроскопии (atomic force microscope, AFM) основан на регистрации силового взаимодействия между исследуемым образцом, иммобилизованным на атомарно-гладкую поверхность, и наноразмерным зондом (рис. 5).

Использование данного метода позволяет визуализировать мономерное или олигомерное состояние белковых молекул на основе анализа высот белковых структур, исследовать образование белок-белковых комплексов, каталитическую активность, конформационные изменения цитохрома P450 в процессе ферментативного катализа [123]. С помощью метода AFM были визуализированы и определены высоты на поверхности слюды индивидуальных компонентов цитохром P450-содержащей системы *Pseudomonas putida*: путидаредоксин редуктаза (PdR), путидаредоксин (Pd), и CYP101A1, а также образование двойных комплексов PdR/Pd, Pd/CYP101A1, PdR/CYP101A1, и тройного комплекса – PdR/Pd/CYP101A1 [124]. Кроме того, методом AFM были зарегистрированы CPR, CYP2B4, cyt b_5 , и их двойные – CPR/CYP2B4, CYP2B4/cyt b_5 комплексы и тройной комплекс – CPR/CYP2B4/cyt b_5 [125].

Метод AFM применялся для исследования каталитической активности CYP102A1 [102] по регистрации изменения высоты молекулы при взаимодействии с субстратом в присутствии NADPH в качестве донора электронов.

Метод атомно-силовой микроскопии применяется в качестве контроля мономерного состояния цитохромов P450 при иммобилизации на поверхности биосенсоров [126], а также для определения оптимального модификатора поверхности, в том числе при совместной иммобилизации с белками-партнёрами [127, 128], CYP17A1 и CYP19A1 [129].

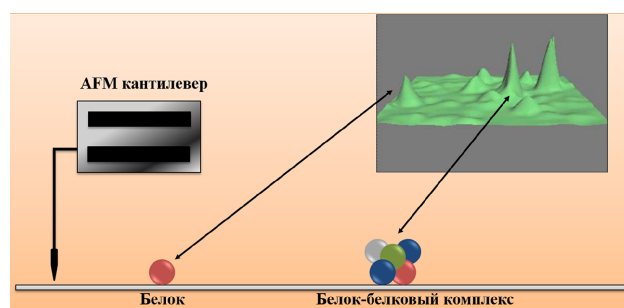


Рисунок 5. Принцип работы атомно-силового микроскопа. На врезке представлены экспериментальные данные, полученные с помощью атомно-силового микроскопа в лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ (печатается с разрешения заведующего лабораторией, д.б.н., профессора Иванова Юрия Дмитриевича).

AFM является эффективным методом для исследования межмолекулярных взаимодействий в цитохром P450-содержащих системах, контроля процесса олигомеризации изоферментов, в том числе при создании биосенсорных систем, и определения каталитической активности изоферментов на уровне единичных молекул.

6. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

На сегодняшний день фармакогенетические подходы, включающие анализ генов изоферментов цитохрома P450, участвующих в биотрансформации лекарственных препаратов, используются для оптимизации лекарственной терапии [130, 131]. Некоторые полиморфизмы генов изоферментов цитохрома P450 человека, приводящие к снижению скорости метаболизма лекарственных препаратов, не изменяют аминокислотную последовательность молекулы фермента, а снижают экспрессию гена или влияют на сплайсинг [132]. Повышение скорости метаболизма лекарственных препаратов может быть связано как с изменением аминокислотной последовательности, так и с увеличением числа копий генов [133], а также изменением последовательности промоторного участка гена. Традиционно большинство генотипических тестов, включающих в себя использование ПЦР для амплификации ДНК и последующее определение последовательности различными способами, такими как анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, анализ однопочечного конформационного полиморфизма, аллель-специфичный ПЦР-анализ и др., проводят в исследовательских лабораториях [134]. Разработаны тест-системы для генотипирования клинически значимых изоферментов CYP2C19 и CYP2D6 AmpliChip™. Анализ с их помощью включает в себя пять стадий: ПЦР-амплификация очищенной ДНК, фрагментация и мечение продуктов амплификации, гибридизация ампликонов на чипе, сканирование чипа, определение генотипов и предсказание на их основе фенотипов изоферментов цитохрома P450 [135]. Таким образом, методы молекулярно-генетического анализа позволяют предсказать возможные изменения диапазонов концентраций (сдвиги “терапевтических окон”) многих лекарственных препаратов, метаболизируемых изоферментами цитохрома P450, для конкретного пациента.

7. АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ ЭЛЕКТРОНОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЦИТОХРОМОВ P450

Ключевой стадией в каталитическом цикле цитохромов P450 является присоединение первого электрона к ферри (Fe^{III}) форме гемопротеина, поставляемого от NADPH (рис. 1). Использование альтернативных источников электронов, таких как фотовосстановление [136-141], или электродных реакций [142] применимо для инициирования каталитического цикла цитохромов P450.

Метод с использованием цинка как источника электронов по типу “гальванический элемент” $Zn + 2 Fe^{+3} \rightarrow Zn^{+2} + 2Fe^{+2}$ не получил дальнейшего развития. При взаимодействии с активными металлами цитохромы P450 частично инактивируются, однако, использование Zn в составе нанокompозитных материалов, возможно, позволит решить эту проблему.

7.1. Фотовосстановление цитохромов P450

Методы фотовосстановления разрабатываются в основном для использования синтетического потенциала цитохромов P450. При фотовосстановлении для получения электронов ферри (Fe^{III}) формой гемопротеина необходимы фотосенсибилизаторы, такие как наночастицы CdS, 3,10-диметил-5-деазафлавин, эозин Y, FAD, FMN, рибофлавин [141], а также доноры электронов, например, ЭДТА. При этом события могут развиваться по трём сценариям: 1) генерация активных форм кислорода *in situ* и протекание реакции по пероксигеназному пути, при этом необходима большая концентрация пероксида водорода, а это дестабилизирует гемопротеин, такой путь возможен только для ферментов, устойчивых к пероксиду водорода [143]; 2) восстановление гема через белки редокс-партнеры в присутствии фотосенсибилизаторов; основной проблемой является выбор соединения, не восстанавливающего кислород с последующим образованием АФК, но передающим электроны на флавиновые нуклеотиды, а затем на гем (таких как деазафлавин в присутствии ЭДТА); 3) фотогенерация активных восстановителей, например, производных Ru(II), для прямого восстановления гема [144]. Фотовосстановление было исследовано, в основном, с использованием бактериальных изоферментов P450 (CYP101A1, CYP102A1 (BM3), CYP152A1, CYP152A2) для получения гидроксилированных производных камфоры, миристиновой и лауриновой кислот. Использование энергии видимого света для катализа цитохромов P450 является перспективным направлением исследований, но пока находится в состоянии развития (“is still in its infancy”, цитируя одного из авторов этого направления) [141].

7.2. Электрохимические методы

В данном разделе будут подробно проанализированы электрохимические методы, которые наиболее полно применимы для анализа каталитической активности при разработке биосенсорных систем медицинского назначения.

Идея использования электрода как источника электронов для восстановления иона железа гема различных изоферментов цитохрома P450 была впервые реализована в работах [145-149]. Электрохимические методы позволяют инициировать катализ и избежать использования сервисных белков редокс-партнеров [142, 150]. На рисунке 6 представлены схемы переноса электрона в реконструированной и электрохимической системах.

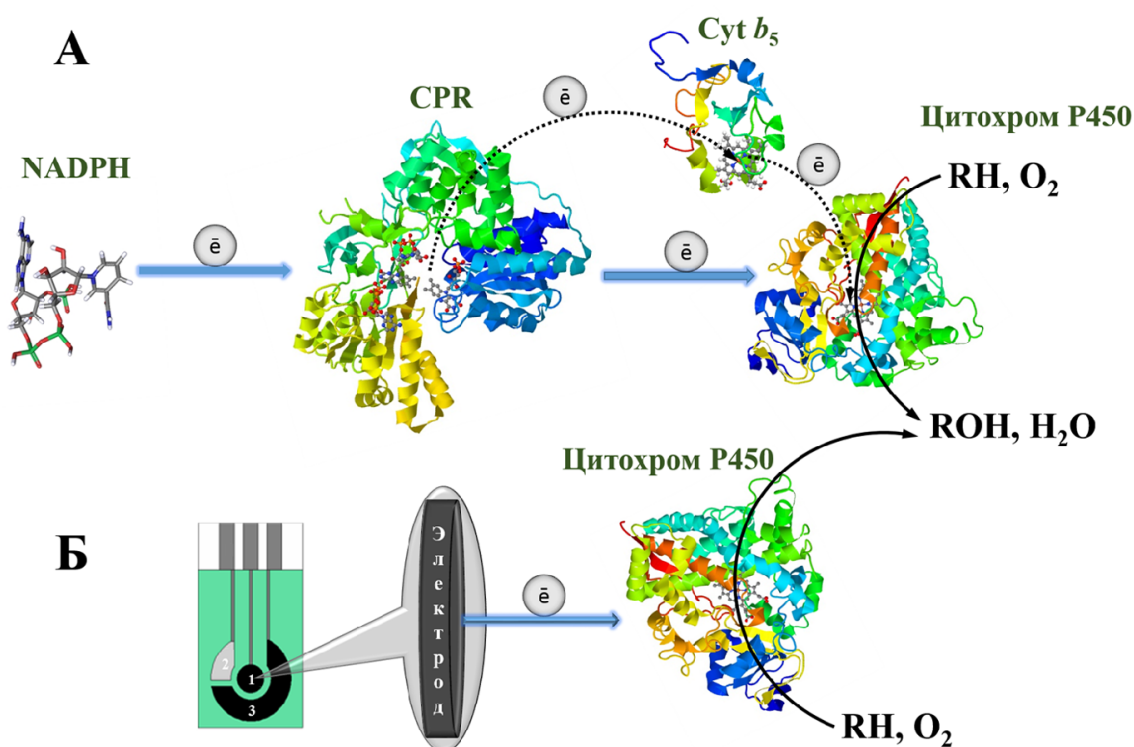


Рисунок 6. Схемы переноса электрона в реконструированной (А) и электрохимической (Б) системах и инициирования каталитической реакции по отношению к субстрату (RH) с образованием окисленного продукта (ROH). Условные обозначения на печатном графитовом электроде: 1 - рабочий графитовый электрод; 2 - хлорсеребряный электрод сравнения; 3 - вспомогательный графитовый электрод. Трёхмерные структуры белков взяты из базы данных PDB (CPR - ID 3QE2; cyt b₅ - ID 2I96; Цитохром P450 - ID 4I3Q); структура NADPH - из базы данных PubChem (CID 5884).

Уникальностью электрохимических методов анализа цитохрома P450 является регистрация и детальный анализ отдельных стадий каталитического цикла, таких как восстановление иона железа гема, связывание восстановленной формы с кислородом, взаимодействие с субстратами и/или ингибиторами. Количественные закономерности электрохимических параметров позволяют транслировать их в кинетические [142, 150], каталитические [151] и термодинамические [152] аспекты функционирования, этих ферментов. Кроме того, с помощью 96-канальных платформ на основе модифицированных электродов можно многократно повысить производительность анализа скорости метаболизма различных мутантных форм изоферментов цитохрома P450 [153].

7.2.1 Методы модификации электродов

Взаимодействие белков с твёрдыми поверхностями – одна из фундаментальных проблем при решении биотехнологических задач [154]. В электрохимии эта проблема подразделяется на две: стабильность фермента на поверхности электрода и эффективность электронного транспорта [155]. Модификация электродной поверхности различными биосовместимыми материалами с целью дальнейшей иммобилизации цитохрома P450 предотвращает денатурацию фермента и зарекомендовала себя как лучшая стратегия создания электрохимических систем на основе изоферментов цитохрома P450 [142]. Включение в модификатор композитных материалов на основе

различных наноматериалов (наночастиц золота, углеродных наноматериалов) повышает эффективность стадии переноса электронов и обеспечивает каждую наноразмерную биомолекулу “своим собственным наноэлектродом” [155-158].

В большей части работ, посвященных изучению цитохрома P450, иммобилизованного на электроде в тонкие плёнки на основе липидоподобных соединений, используют дидодецилдиметиламмония бромид (ДДАБ) на стекло-углеродном или пирографитовом электроде. При комнатной температуре ДДАБ формирует стабильную жидкокристаллическую плёнку, а положительный заряд четвертичного атома азота позволяет ему взаимодействовать с отрицательно заряженными графитовыми электродами. С помощью модификации ДДАБ были исследованы изоферменты цитохрома P450 семейства 2C (2C9, 2C18 и 2C19) [159], цитохром P450 17A1 (CYP17A1 человека, быка, свиньи) [160], митохондриальный CYP27B1 [161], катализирующий гидроксирование 25-гидроксивитамина D₃ с образованием активного метаболита. Субстраты CYP17A1 – прегненолон, прогестерон и их 17α-гидроксированные производные – не влияли на восстановительный потенциал гемопротеина. Таким образом, показано, что изменение спинового состояния иона железа гема при связывании цитохромов P450 с субстратами не всегда коррелирует с регистрируемым изменением редокс-потенциала.

Электроды, полученные методом трафаретной печати, позволяют использовать относительно малое количество фермента, являются взаимозаменяемыми, имеют широкий диапазон рабочих потенциалов [162]. На сегодняшний день активно разрабатывается технология получения печатных графитовых электродов на основе бумаги (paper-based electrodes), перспективных для создания диагностических биосенсоров [162]. Преимуществом таких электродов является возможность использования свойств различных типов бумаги: гидрофильность, пористость, высокая площадь поверхности. Кроме того, на поверхности печатных электродов на основе бумаги возможно проведение хроматографического разделения аналитов и проведение анализа в режиме микрофлюидики [163].

Для иммобилизации изоферментов цитохрома P450 также применяют метод встраивания ферментов в полимеры или гели. Чаще всего используют токопроводящие полимеры на основе полипиррола. Электрокаталитические свойства CYP2B4 и бактериальных CYP101A1, CYP102A1 были исследованы с помощью электродов, модифицированных полипирролом, полученным электрополимеризацией и химическим синтезом на золотых электродах и на электродах из оксида индия, допированного оловом [164-166]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что электрополимеризация предпочтительна при разработке электрохимических систем на основе цитохрома P450, поскольку при таком подходе лучше сохраняется активность ферментов [165]. При встраивании цитохрома P450 в гидрофильные гели часто используют различные наночастицы или липидоподобные вещества с целью повышения проводимости материала или стабильности цитохрома P450. Предварительное добавление ДДАБ к CYP101A1 до встраивания в золь-гель метилтриэтоксисилана позволило создать липидоподобное микроокружение на поверхности стеклоглеродного электрода [167]. Электрохимический биосенсор на основе стеклоглеродного электрода и встроенного в полиакриламидный гидрогель CYP2C9 был сконструирован и использован для определения бисфенола А [168]. Авторы показали, что плёнки на основе полиакриламидного гидрогеля улучшают взаимодействие CYP2C9 с электродом. Самоорганизующиеся монослои (СОМ) алкантиолов или меркаптокарбоновых кислот на поверхности электродов используются для ковалентной иммобилизации цитохромов P450 на поверхности золотых электродов [142, 150]. На основании электрохимической формы уравнения Михаэлиса-Ментен авторы определили значение K_M CYP2C9 по отношению к S-варфарину как субстрату, которое находилось в хорошей корреляции со значением K_M , полученным с помощью реконструированной системы ранее [169]. Электрохимические платформы на основе CYP2C9, CYP2D6 и их полиморфных форм, ковалентно иммобилизованных на электроде с напыленным поликристаллическим золотом, были разработаны в работе [170]. Анализ электрокаталитической

активности этих изоферментов проводился амперометрическим методом с использованием S-варфарина и буфуралола в качестве субстратов для CYP2C9 и CYP2D6, соответственно. Авторы отмечают, что значения K_M могут быть рассчитаны из зависимостей каталитического тока ферментов от концентрации субстратов в электрохимической системе, однако значение k_{cat} – только с помощью количественного определения продуктов электрокаталитических реакций, поскольку рассчитанное по электрохимической форме уравнения Михаэлиса-Ментен значение k_{cat} отражает суммарную активность цитохрома P450, то есть как монооксигеназную, так и оксидазную.

7.2.2. Анализ межлекарственных взаимодействий с помощью электрохимических систем на основе изоферментов цитохрома P450

Наиболее активные участники метаболизма лекарственных препаратов – цитохромы P450 семейства 3A, 2C и 2D. Электрохимические CYP3A4, CYP2C9 и CYP2D6 системы были сконструированы для анализа межлекарственных взаимодействий [157, 171]. CYP2D6 катализирует O-деметилирование трамадола. В присутствии хинидина происходит концентрационнозависимое снижение электрокаталитической активности CYP2D6 по отношению к трамадолу. CYP3A4, иммобилизованный на стеклоглеродном электроде, модифицированном полидиаллилдиметиламмония хлоридом, катализирует N-деметилирование эритромицина, реакцию, характерную для этого изофермента цитохрома P450 [172]. В присутствии ингибиторов CYP3A4 – кетоконазола, циметидина – происходит снижение N-деметилазной электрокаталитической активности фермента по отношению к эритромицину. Кроме того, несмотря на то, что диклофенак является субстратом CYP3A4 и метаболизируется этим изоферментом с образованием 5-гидроксидиклофенака, авторы показали, что прединкубация CYP3A4 с диклофенаком также вызывала снижение электрокаталитической активности фермента по отношению к эритромицину, поскольку известно, что продукт реакции 5-гидроксидиклофенак способен ингибировать этот изофермент. С помощью разработанной электрохимической системы доказан эффект усиления ингибирующего действия диклофенака на N-деметилазную активность CYP3A4 по отношению к эритромицину, что связано с гетеротропной кооперативностью, хорошо известной для изоферментов цитохрома P450. Таким образом, показано, что подобные электрохимические системы на основе цитохрома P450 могут быть успешно использованы при выявлении лекарственной интерференции и предсказания побочных эффектов от проводимой фармакотерапии.

7.2.3. Анализ субстрат-ингибиторного потенциала изоферментов цитохрома P450

Изоферменты цитохрома P450, участвующие в метаболизме стероидных гормонов, являются молекулярными мишенями при разработке лекарственных соединений, в том числе противоопухолевых.

С помощью пирографитового электрода, модифицированного ДДАБ, исследовались электрохимические свойства CYP17A1 разных видов: *Homo sapiens*, *Bos taurus taurus*, *Sus scrofa domestica* [160]. Для всех исследованных CYP17A1 наблюдали обратимый перенос электронов между ионом железа гема и электродом и катализ в присутствии субстратов CYP17A1 – прегненолона, прогестерона и их 17 α -гидроксированных производных. Электроды с иммобилизованным CYP17A1 были исследованы как тест-системы для скрининга субстратов и ингибиторов среди производных прегненолона [173], а также для исследования ингибирующего действия оксазолиновых производных 17(20)E-прегнена [174-177].

Электрохимические системы на основе иммобилизованных на печатном графитовом электроде, модифицированном коллоидным раствором золота, стабилизированным ДДАБ, рекомбинантных форм изоферментов цитохрома P450 (CYP2B4, CYP1A2, CYP3A4, CYP11A1 и стерол-14 α -деметилазы (CYP51) *Mycobacterium tuberculosis* как мишени противотуберкулёзных препаратов) были разработаны и применены для скрининга субстратов и ингибиторов соответствующих изоферментов [178, 179].

7.2.4. Использование микросом в электрокатализе изоферментов цитохрома P450

Кроме электрохимических систем на основе рекомбинантных изоферментов цитохрома P450, в ряде работ были сконструированы электрохимические системы на основе микросом. Микросомы с высокоэкспрессированными CYP1A2 или CYP3A4 были иммобилизованы на пирографитовом электроде, модифицированном полиэтиленгликолем с применением стратегии послойной адсорбции плёнок [180]. Перенос электронов от электрода к цитохрому P450 в таких системах осуществлялся через белок-посредник – CPR. Способность микросом, иммобилизованных на электроде, осуществлять катализ была подтверждена путём обнаружения продукта окисления стирена – оксида стирена. Микросомы, содержащие CYP3A4 и CPR, иммобилизованные на золотых электродах, модифицированных тио-2-нафтолом или тиофенолом [181] были каталитически активны по отношению к субстрату тестостерону. Система была чувствительна к присутствию ингибитора кетоконазола: авторы отмечали концентрационно зависимое снижение каталитического тока в присутствии тестостерона. Образование продукта CYP3A4-зависимой биотрансформации тестостерона – 6 β -гидрокситестостерона – было зарегистрировано с помощью ВЭЖХ. Позднее, этой группой авторов были сконструированы электрохимические системы на основе микросом, содержащих CYP2C9*1 или его полиморфные формы CYP2C9*2 и CYP2C9*3 [182]. Авторы исследовали электрокаталитическую активность микросом, содержащих CYP2C9, по каталитическому току в присутствии толбурамида и S-варфарина. Полученные ферментные электрохимические системы катализировали гидроксирование субстрата

CYP2C9 – толбурамида – с образованием продукта реакции 4-гидрокситолбурамида, что подтверждалось методом ВЭЖХ. В работе [183] авторы проводили иммобилизацию микросом, содержащих CYP1A2, на печатные графитовые электроды, модифицированные многостеночными углеродными нанотрубками (МУНТ), и применяли полученные биосенсорные системы для определения нестероидного противовоспалительного препарата напроксена в сыворотке крови. Сконструированный таким образом электрохимический биосенсор имел высокую чувствительность по отношению к напроксену (предел определяемых концентраций 16 \pm 1 мкМ). Микросомы могут быть иммобилизованы на поверхности пирографитовых и стеклоуглеродных электродов. Так, микросомы печени были иммобилизованы на поверхности таких электродов, что позволило получить электрохимические системы, способные осуществлять катализ по отношению к тестостерону [184]. Авторы отмечают, что достоинствами таких систем являются простота изготовления и возможность использования в токсикологии и при разработке лекарств.

Показана возможность использования в электрохимических системах бактериальных клеток (*E. coli*), экспрессирующих изофермент цитохрома P450, например, CYP102A1 (BM3) [185].

7.2.5. Белок-белковые взаимодействия в цитохром P450-содержащих системах

Электрохимические методы могут быть использованы для исследования белок-белковых взаимодействий в цитохром P450-содержащих системах. Группа Мартин (L.L. Martin) исследовала изменение электрон-транспортной кинетики CYP17A1 при образовании комплекса с цит b_5 дикого типа, в то время как при анализе взаимодействия с мутантным типом цит b_5 E48G/E49G этого эффекта не наблюдалось [186]. Кроме того, авторы сравнивали количество электроактивного (Γ_0) CYP17A1 на поверхности электрода, модифицированного углеродными нанотрубками, с суммарным количеством электроактивного вещества (Γ_0) при анализе взаимодействия CYP17A1 с цит b_5 дикого и мутантного типов, при этом цит b_5 дикого типа не вызывал значительного увеличения электроактивного фермента, в то время как цит b_5 E48G/E49G увеличивал количество электроактивного вещества на электроде. Авторы заключили, что при образовании комплекса CYP17A1 с цит b_5 дикого типа не происходит обмена электронов между цит b_5 и электродом, а цит b_5 E48G/E49G, не образующий комплекса с CYP17A1, свободно обменивается электронами с электродом.

Исследование взаимодействия CYP3A4 с различными изоформами цит b_5 (микросомальной и митохондриальной) электрохимическими методами было проведено в работе [187]. Методом циклической вольтамперометрии было показано, что митохондриальная форма цит b_5 не изменяла величину каталитического тока CYP3A4 при внесении в электрохимическую систему субстрата – тестостерона, в то время как значение каталитического тока в присутствии микросомальной цит b_5 возрастало

примерно в 2 раза. Методами хромато-масс-спектрометрического анализа установлено, что микросомальный, в отличие от митохондриального, цит b_5 увеличивает гидроксилазную активность СУР3А4 в электрохимической системе по отношению к тестостерону на 25%.

7.2.6. Изоферменты цитохрома P450

как биореакторы для решения биотехнологических задач

Цитохромы P450 представляют значительный интерес для решения биотехнологических задач, поскольку осуществляют широкий спектр химических реакций с высокой регио- и/или стереоспецифичностью, катализируя окисление (оксифункционализацию) большого разнообразия неактивных молекул, которые могут являться предшественниками (прекурсорами) для синтеза физиологически активных соединений [188]. Несмотря на высокий биотехнологический потенциал изоферментов цитохрома P450, в числе важнейших ограничивающих широкомасштабное биотехнологическое использование факторов можно отметить следующие: 1) относительно низкая, по сравнению с другими ферментами, каталитическая активность, обусловленная их физиологической ролью и сложностью каталитического цикла; 2) необходимость использования дорогостоящих коферментов NADPH или NADH, а также редокс-партнерных белков; 3) неполное сопряжение каталитического цикла и образование активных форм кислорода (АФК), и, как следствие, инактивация цитохромов P450 [188, 189]. Эти проблемы могут быть решены с помощью электрохимических систем на основе биотехнологически значимых изоферментов цитохрома P450 [190-194]. В англоязычной литературе для такого рода систем используется термин “reactor plugged to a wall socket” (“реактор, подключённый к розетке”) [188].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что цитохром P450 был впервые охарактеризован более 50 лет назад и к настоящему моменту описано большое количество различных изоферментов этого суперсемейства, новые методы и подходы к исследованию физико-химических и каталитических свойств этой группы гем-содержащих ферментов активно разрабатываются. В таблице приведены сравнительные характеристики проанализированных в обзоре методов.

Большие успехи в исследовании механизмов отдельных стадий катализа изоферментов цитохрома P450 были достигнуты благодаря применению абсорбционной, флуоресцентной, мёссбауэровской и рентгеновской спектроскопии, а также спектроскопии ядерного магнитного и электронного парамагнитного резонансов. Современный подход к исследованию каталитической активности и субстрат-ингибиторного потенциала изоферментов цитохрома P450 базируется на применении высокочувствительных методов хромато-масс-спектрометрии с целью количественного анализа метаболитов цитохром P450-

зависимых реакций. При исследовании механизмов цитохром P450-зависимого катализа, особенно при изучении вновь открываемых изоферментов, широко применяется ЯМР спектроскопия с целью установления химической структуры продуктов реакций. С помощью метода поверхностного плазмонного резонанса можно решать задачи высокопроизводительного скрининга лигандов (субстратов и ингибиторов) цитохрома P450, определять кинетические и термодинамические параметры комплексообразования. Активно развиваются нанотехнологические подходы к исследованию изоферментов цитохрома P450, такие как атомно-силовая микроскопия, с помощью которой можно исследовать каталитическую активность фермента на уровне единичных молекул, а также образование белок-белковых комплексов в цитохром P450-содержащих системах. Параллельно с развитием исследований изоферментов цитохрома P450 в реконструированных системах разрабатываются электрохимические методы анализа каталитической активности этих ферментов. Отсутствие необходимости реконструирования электрон-транспортной цепи и использования восстановительных коферментов, возможность регистрации каталитической активности по изменению электрохимических параметров привлекает всё большее внимание исследователей к разработке электрохимических систем на основе рекомбинантных изоферментов цитохрома P450 при исследовании их субстрат-ингибиторного потенциала, механизмов и способов регуляции катализа, межлекарственной интерференции. Кинетические, стехиометрические и термодинамические параметры подтверждают адекватность электрохимических систем для исследования каталитической активности изоферментов цитохрома P450. Тенденции дальнейшего развития электрохимических систем на основе цитохрома P450 связаны с применением современных нанокompозитных материалов на основе углерода и наночастиц металлов для модификации электродов с целью увеличения чувствительности анализа и повышения скорости переноса электронов. Стоит особо подчеркнуть, что использование электрохимических систем на основе изоферментов цитохрома P450 в сопряжении с хромато-масс-спектрометрическими методами определения продуктов электрокаталитических реакций позволяет проводить более детальный анализ субстрат-ингибиторного потенциала этих ферментов и механизмов каталитических реакций в электрохимических системах, в том числе для вновь открываемых изоферментов. Кроме того, имеются предпосылки для биотехнологического применения электрохимических систем на основе изоферментов цитохрома P450 как перспективного подхода к созданию биореакторов для получения биологически активных соединений, в том числе лекарственных препаратов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект №17-75-20250).

Таблица. Сравнительные характеристики методов определения функциональной активности цитохромов P450

Метод	Возможности метода	Особые условия	Ссылки
Реконструированные системы	Являются классическими методами определения каталитической активности изоферментов цитохрома P450. Применимы для исследования <i>функциональной</i> активности фермента	Требуют наличия всех участников цепи переноса электронов (редокс-партнёрных белков, восстановительных коферментов) и фосфолипидов	[1]
Абсорбционная спектроскопия	Определение по типу связывания субстратов и ингибиторов Расчёт констант диссоциации Количественное определение продуктов реакции, поглощающих в ультрафиолетовом или видимом диапазоне спектра	Тип спектральных изменений позволяет только предположить субстратные или ингибиторные свойства соединения	[17]
Флуоресцентная спектроскопия	Определение каталитической активности фермента по отношению к флуорогенному субстрату и её изменения в присутствии других субстратов, ингибиторов и активаторов	Не позволяет определить субстратные или ингибиторные свойства лиганда, не являющегося флуорофором. Большинство стероид-метаболизирующих изоферментов цитохрома P450 из-за их высокой субстратной специфичности не имеют синтетических флуорогенных субстратов	[58-63]
Электронный парамагнитный резонанс	Определение участков связывания и интермедиатов каталитического цикла, исследование механизма катализа и отдельных стадий каталитического цикла	Может не отражать реального спинового состояния, которое зависит в том числе и от температуры; регистрация спектров ЭПР проводится с использованием гелиевых криостатов при температуре 77 К или ниже (часто при 12-15 К)	[67, 69-71, 195]
Спектроскопия ядерного магнитного резонанса	Определение аминокислотных участков связывания на полипептидной цепи белка Установление химической структуры продуктов цитохром P450-зависимых каталитических реакций. Метод применим для исследования <i>структурных</i> аспектов	Метод требует большие концентрации гемопroteина (10^{-4} – 10^{-3} М) и изотопного обогащения изофермента цитохрома P450 или его субстрата при работе с растворами, содержащими липиды	[72-78]
Рамановская спектроскопия (спектроскопия комбинационного рассеяния)	Определение конформационных изменений изоферментов цитохрома P450 при связывании с субстратами или ингибиторами	Конформационные изменения могут быть вызваны как субстратами, так и ингибиторами, поэтому отнесение новых соединений к группе субстратов или ингибиторов невозможно	[80-86, 196]
Мёссбауэровская спектроскопия	Определение электрических и магнитных взаимодействий ядра атома железа с его окружением. Метод применим для исследования <i>структурных</i> аспектов белковой молекулы	Включение ^{57}Fe в гем цитохрома P450 Температура не выше 4,2 К	[88-91]
Рентгеноструктурный анализ и рентгеновская спектроскопия	Определение длины связи металла с лигандом, а также координационных атомов и их количества в металлоферментах	Метод рентгеноструктурного анализа требует получения кристаллов белков	[95-98]
Хроматографические/хромато-масс-спектрометрические методы	Идентификация и количественная оценка продуктов каталитических реакций цитохромов P450 Качественный и количественный протеомный анализ изоферментов цитохрома P450 в биологических образцах	Ряд продуктов цитохром P450-зависимых реакций, такие как стероиды, сложно анализировать масс-спектрометрически вследствие их слабой ионизации и неустойчивости ионизированных форм	[99-113]
Метод поверхностного плазмонного резонанса	Анализ взаимодействий низкомолекулярных соединений с изоферментами цитохрома P450 и белок-белковых взаимодействий в цитохром P450-содержащих системах, определение кинетических и термодинамических параметров комплексообразования	Не позволяет определить участок белка, связывающийся с лигандом	[117-121]

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЦИТОХРОМА P450

Таблица. Сравнительные характеристики методов определения функциональной активности цитохромов P450 (продолжение)

Метод	Возможности метода	Особые условия	Ссылки
Метод атомно-силовой микроскопии	Визуализация мономерного или олигомерного состояния белковых молекул. Исследование образования белок-белковых комплексов. Определение каталитической активности изоферментов на уровне единичных молекул.	Работа со специально подготовленными подложками.	[123-125]
Молекулярно-генетические методы	Исследование полиморфизмов и уровня экспрессии генов изоферментов цитохрома P450.	На реальную активность могут влиять не только генетические факторы.	[130, 131]
Электрохимические методы	Определение электрохимических и электрокаталитических параметров изоферментов цитохрома P450; не требуют реконструирования цепи переноса электронов, каталитическая реакция инициируется восстановлением иона железа гема цитохрома P450 электронами с электрода. Позволяет регистрировать отдельные стадии каталитического цикла цитохрома P450. Метод применим для исследования функциональных аспектов катализа.	Электрохимический сигнал отражает как монооксигеназную, так и оксидазную активности цитохрома P450. Метод требует модификации рабочего электрода.	[142, 150, 151]

ЛИТЕРАТУРА

- Archakov A.I., Bachmanova G.I. (1990) Cytochrome P-450 and active oxygen, Taylor & Francis Group, London.
- Sono M., Roach M.P., Coulter E.D., Dawson J.H. (1996) Chem. Rev., **96**, 2841-2888.
- Guengerich F.P. (2001) Chem. Res. Toxicol., **14**, 611-650.
- Bernhardt R. (2006) J. Biotechnol., **124**, 128-145.
- Korošec T., Ačimović J., Seliškar M., Kocjan D., Tacer K.F., Rozman D., Urleb U. (2008) Bioorganic Med. Chem., **16**, 209-221.
- Akhtar M., Wright J.N., Lee-Robichaud P. (2011) J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **125**, 2-12.
- Ortiz de Montellano P.R. (2015) in: Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry (Ortiz de Montellano P.R., ed.), University of California, San Francisco, California, USA, pp. 111-176.
- Gomez L., Kovac J.R., Lamb D.J. (2015) Steroids, **95**, 80-87.
- Hargrove T.Y., Friggeri L., Wawrzak Z., Sivakumaran S., Yazlovitskaya E.M., Hiebert S.W., Guengerich F.P., Waterman M.R., Lepesheva G.I. (2016) J. Lipid Res., **57**, 1552-1563.
- Guengerich F.P. (2015) in: Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry (Ortiz de Montellano P.R., ed.), Springer International Publishing, Switzerland, pp. 523-785.
- Garfinkel D. (2003) Arch. Biochem. Biophys., **409**, 7-15.
- Klingenberg M. (1958) Arch. Biochem. Biophys., **75**, 376-386.
- Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 2379-2385.
- Estabrook R.W., Cooper D.Y., Rosenthal O. (1963) Biochem. Z., **338**, 741-755.
- Poulos T.L., Johnson E.F. (2015) in: Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry (Ortiz de Montellano P.R., ed.), Springer International Publishing, Switzerland, pp. 3-32.
- Rein H., Ristau O., Friedrich J., Jänig G.R., Ruckpaul K. (1977) FEBS Lett., **75**, 19-22.
- Метелица Д.И. (1982) Активация кислорода ферментными системами, Наука, Москва, с. 256.
- Hannemann F., Bichet A., Ewen K.M., Bernhardt R. (2007) BBA General Subjects, **1770**, 330-344.
- Waskell L., Kim J.-J.P. (2015) in: Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry (Ortiz de Montellano P.R., ed.), Springer International Publishing, Switzerland, pp. 33-68.
- Schenkman J.B., Jansson I. (2003) Pharmacol. Ther., **97**, 139-152.
- Denisov I.G., Makris T.M., Sligar S.G., Schlichting I. (2005) Chem. Rev., **105**, 2253-2277.
- Ахрем А.А., Шкуматов В.М., Чащин В.Л. (1977) Биоорган. химия, **3**, 780-786.
- Yamazaki H., Shimada T. (2006) in: Cytochrome P450 Protocols (Phillips I.R., Elizabeth A.S., eds.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, pp. 61-72.
- Nazarov P.A., Drutsa V.L., Miller W.L., Shkumatov V.M., Luzikov V.N., Novikova L.A. (2003) DNA Cell Biol., **22**, 243-252.
- McLean K.J., Girvan H.M., Munro A.W. (2007) Expert Opin. Drug Metab. Toxicol., **3**, 847-863.
- Choi K.Y., Jung E.O., Yun H., Yang Y.H., Kim B.G. (2014) Appl. Microbiol. Biotechnol., **98**, 8191-8200.
- Johnson E.O.D., Wong L.-L. (2016) Catal. Sci. Technol., **6**, 7549-7560.
- Wei Y., Ang E.L., Zhao H. (2018) Curr. Opin. Chem. Biol., **43**, 1-7.
- Ortega Ugalde S., Luirink R.A., Geerke D.P., Vermeulen N.P.E., Bitter W., Commandeur J.N.M. (2018) J. Inorg. Biochem., **180**, 47-53.
- Denisov I.G., Shih A.Y., Sligar S.G. (2012) J. Inorg. Biochem., **108**, 150-158.
- Reed J.R., Cruz A.L.N.D., Lomnicki S.M., Backes W.L. (2015) Biochem. Pharmacol., **95**, 126-132.
- Bhattarai S., Liou K., Oh T.J. (2013) Arch. Biochem. Biophys., **539**, 63-69.
- Khatir Y., Ringle M., Lisurek M., VonKries J.P., Zapp J., Bernhardt R. (2016) ChemBioChem, **17**, 90-101.
- Baravalle R., Di Nardo G., Bandino A., Barone I., Catalano S., Andm S., Gilardi G. (2017) J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **167**, 23-32.

35. Baravalle R., Ciaramella A., Baj F., Di Nardo G., Gilardi G. (2018) BBA Proteins Proteomics, **1866**, 88-96.
36. Denisov I.G., Sligar S.G. (2011) BBA Proteins Proteomics, **1814**, 223-229.
37. Mak P.J., Denisov I.G. (2018) BBA Proteins Proteomics, **1866**, 178-204.
38. Luthra A., Gregory M., Grinkova Y.V., Denisov I.G., Sligar S.G. (2013) in: Cytochrome P450 Protocols (Phillips I.R., Shephard E.A., Ortiz de Montellano P.R., eds.), Humana Press Inc., New York, pp. 115-128.
39. Bayburt T.H., Carlson J.W., Sligar S.G. (1998) J. Struct. Biol., **123**, 37-44.
40. Bayburt T.H., Carlson J.W., Sligar S.G. (2000) Langmuir, **16**, 5993-5997.
41. Bayburt T.H., Sligar S.G. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., **99**, 6725-6730.
42. Nath A., Koo P.K., Rhoades E., Atkins W.M. (2008) J. Am. Chem. Soc., **130**, 15746-15747.
43. Das A., Varma S.S., Mularczyk C., Meling D.D. (2014) ChemBioChem, **15**, 892-899.
44. Khatri Y., Gregory M.C., Grinkova Y.V., Denisov I.G., Sligar S.G. (2014) Biochem. Biophys. Res. Commun., **443**, 179-184.
45. Khatri Y., Hannemann F., Ewen K.M., Pistorius D., Perlova O., Kagawa N., Brachmann A.O., Müller R., Bernhardt R. (2010) Chem. Biol., **17**, 1295-1305.
46. Luthra A., Denisov I.G., Sligar S.G. (2011) Arch. Biochem. Biophys., **507**, 26-35.
47. Isin E.M., Guengerich F.P. (2008) Anal. Bioanal. Chem., **392**, 1019-1030.
48. Sevrionkova I.F., Poulos T.L. (2015) in: Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450 (Hrycay E.G., Bandiera S.M., eds.), Springer International Publishing, Cham, pp. 83-105.
49. Remmer H., Schenkman J., Estabrook R.W., Sasame H., Gillette J., Narasimulu S., Cooper D.Y., Rosenthal O. (1966) Mol. Pharmacol., **2**, 187-190.
50. Imai Y., Sato R. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun., **22**, 620-626.
51. Schenkman J.B., Cinti D.L., Orrenius S., Moldeus P., Kraschnitz R. (1972) Biochemistry, **11**, 4243-4251.
52. von Kries J.P., Warrior T., Podust L.M. (2010) Current Protocols in Microbiology, John Wiley & Sons, Inc., pp. 16:17.4:17.4.1-17.4.25.
53. Simgen B., Contzen J., Schwarzer R., Bernhardt R., Jung C. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun., **269**, 737-742.
54. Khatri Y., Hannemann F., Girhard M., Kappl R., Mème A., Ringle M., Janocha S., Leize-Wagner E., Urlacher V.B., Bernhardt R. (2013) Biotechnol. Appl. Biochem., **60**, 18-29.
55. Kunze K.L., Nelson W.L., Kharasch E.D., Thummel K.E., Isoherranen N. (2006) Drug Metab. Dispos., **34**, 583-590.
56. Pearson J.T., Hill J.J., Swank J., Isoherranen N., Kunze K.L., Atkins W.M. (2006) Biochemistry, **45**, 6341-6353.
57. Kenaan C., Zhang H., Hollenberg P.F. (2013) in: Cytochrome P450 Protocols (Phillips I.R., Shephard E.A., Ortiz de Montellano P.R., eds.), Springer Science+Business Media, New York, pp. 61-69.
58. Burke M.D., Thompson S., Elcombe C.R., Halpert J., Haaparanta T., Mayer R.T. (1985) Biochem. Pharmacol., **34**, 3337-3345.
59. Stresser D.M., Turner S.D., Blanchard A.P., Miller V.P., Crespi C.L. (2002) Drug Metab. Dispos., **30**, 845-852.
60. White I.N.H. (1988) Anal. Biochem., **172**, 304-310.
61. Venhorst J., Onderwater R.C.A., Meerman J.H.N., Vermeulen N.P.E., Commandeur J.N.M. (2000) Eur. J. Pharm. Sci., **12**, 151-158.
62. Chauret N., Dobbs B., Lackman R.L., Bateman K., Nicoll-Griffith D.A., Stresser D.M., Ackermann J.M., Turner S.D., Miller V.P., Crespi C.L. (2001) Drug Metab. Dispos., **29**, 1196-1200.
63. Chauret N., Tremblay N., Lackman R.L., Gauthier J.Y., Silva J.M., Marois J., Yergey J.A., Nicoll-Griffith D.A. (1999) Anal. Biochem., **276**, 215-226.
64. Donato M.T., Jiménez N., Castell J.V., Gómez-Lechón M.J. (2004) Drug Metab. Dispos., **32**, 699-706.
65. Nayadu S., Behera D., Sharma M., Kaur G., Gudi G. (2013) Int. J. Pharm. Pharm. Sci., **5**, 303-307.
66. Donato M.T., Gómez-Lechón M.J. (2013) in: Cytochrome P450 Protocols (Phillips I.R., Shephard E.A., Ortiz de Montellano P.R., eds.), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 135-148.
67. Lipscomb J.D. (1980) Biochemistry, **19**, 3590-3599.
68. Davydov R., Hoffman B.M. (2011) Arch. Biochem. Biophys., **507**(1), 36-43.
69. Davydov R., Makris T.M., Kofman V., Werst D.E., Sligar S.G., Hoffman B.M. (2001) J. Am. Chem. Soc., **123**, 1403-1415.
70. Roberts A.G., Atkins W.M. (2007) Arch. Biochem. Biophys., **463**, 89-101.
71. Conner K.P., Vennam P., Woods C.M., Krzyaniak M.D., Bowman M.K., Atkins W.M. (2012) Biochemistry, **51**, 6441-6457.
72. OuYang B., Pochapsky S.S., Dang M., Pochapsky T.C. (2008) Structure, **16**, 916-923.
73. Modi S., Sutcliffe M.J., Primrose W.U., Lian L.Y., Roberts G.C.K. (1996) Nat. Struct. Biol., **3**, 414-417.
74. Myers T.G., Thummel K.E., Kalhorn T.F., Nelson S.D. (1994) J. Med. Chem., **37**, 860-867.
75. Cameron M.D., Wen B., Allen K.E., Roberts A.G., Schuman J.T., Campbell A.P., Kunze K.L., Nelson S.D. (2005) Biochemistry, **44**, 14143-14151.
76. Hummel M.A., Gannett P.M., Aguilar J., Tracy T.S. (2008) Arch. Biochem. Biophys., **475**, 175-183.
77. McCullough C.R., Pallela P.K., Im S.C., Waskell L., Sem D.S. (2009) J. Biomol. NMR, **43**, 171-178.
78. Pochapsky T.C., Kazanis S., Dang M. (2010) Antioxid. Redox Signal., **13**, 1273-1296.
79. Shengkarev Z.O., Lyukmanova E.N., Solozhenkin O.I., Gagnidze I.E., Nekrasova O.V., Chupin V.V., Tagaev A.A., Yakimchenko Z.A., Ovchinnikova T.V., Kirpichnikov M.P. et al. (2009) Biochemistry (Moscow), **74**, 756-765.
80. Фрайфелдер Д. (1980) Физическая биохимия (пер. с англ.) Издательство "Мир," Москва, с. 580.
81. Chen Z., Ost T.W.B., Schelvis J.P.M. (2004) Biochemistry, **43**, 1798-1808.
82. Mak P.J., Kaluka D., Manyumwa M.E., Zhang H., Deng T., Kincaid J.R. (2008) Biopolymers, **89**, 1045-1053.
83. Smith S.J., Munro A.W., Smith W.E. (2003) Biopolymers, **70**, 620-627.
84. Hu S., Kincaid J.R. (1991) J. Am. Chem. Soc., **113**, 9760-9766.
85. Deng T.J., Macdonald I.D.G., Simianu M.C., Sykora M., Kincaid J.R., Sligar S.G. (2001) J. Am. Chem. Soc., **123**, 269-278.
86. Mak P.J., Denisov I.G., Grinkova Y.V., Sligar S.G., Kincaid J.R. (2011) J. Am. Chem. Soc., **133**, 1357-1366.
87. Mak P.J., Gregory M.C., Denisov I.G., Sligar S.G., Kincaid J.R. (2015) Proc. Natl. Acad. Sci., **112**, 15856-15861.
88. Маспеев В.Ф. (1998) Соросовский образовательный журнал, **8**, 82-87.
89. Sharrock M., Münck E., Debrunner P.G., Marshall V., Lipscomb J.D., Gunsalus I.C. (1973) Biochemistry, **12**, 258-265.

90. Sharrock M., Debrunner P.G., Schulz C., Lipscomb J.D., Marshall V., Gunsalus I.C. (1976) BBA Protein Struct., **420**, 8-26.
91. Martinho M., Münck E. (2010) in: Physical Inorganic Chemistry: Principles, Methods, and Models (Bakac A., ed.) John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 39-67.
92. DeVore N.M., Scott E.E. (2012) Nature, **482**, 116-119.
93. Ajduković J.J., Djurendić E.A., Petri E.T., Klisurić O.R., Čelić A.S., Sakač M.N., Jakimov D.S., Gaši K.M.P. (2013). Bioorg. Med. Chem., **21**, 7257-7266.
94. Sevrioukova I.F., Poulos T.L. (2013). J. Med. Chem., **56**, 3733-3741.
95. Andersson L.A., Dawson J.H. (1991) Struct. Bond., **74**, 1-40.
96. Cramer S.P., Dawson J.H., Hodgson K.O., Hager L.P. (1978) J. Am. Chem. Soc., **100**, 7282-7290.
97. Shiro Y., Makino R., Sato F., Oyanagi H., Matsushita T., Ishimura Y., Iizuka T. (1991) Biochim. Biophys. Acta, **1115**, 101-107.
98. Sligar S.G., Makris T.M., Denisov I.G. (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun., **338**, 346-354.
99. Dierks E.A., Stams K.R., Lim H.K., Cornelius G., Zhang H., Ball S.E. (2001) Drug Metab. Dispos., **29**, 23-29.
100. Zhang T., Zhu Y., Gunaratna C. (2002) J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. life Sci., **780**, 371-379.
101. Testino S.A.J. Patonay G. (2003) J. Pharm. Biomed. Anal., **30**, 1459-1467.
102. Walsky R.L., Obach R.S. (2004) Drug Metab. Dispos., **32**, 647-660.
103. Turpeinen M., Uusitalo J., Jalonen J., Pelkonen O. (2005) Eur. J. Pharm. Sci., **24**, 123-132.
104. Bhoopathy S., Xin B., Unger S.E., Karnes H.T. (2005) J. Pharm. Biomed. Anal., **37**, 739-749.
105. Dixit V., Hariparsad N., Desai P., Unadkat J.D. (2007) Biopharm. Drug Dispos., **28**, 257-262.
106. Lahoz A., Donato M.T., Picazo L., Gomez-Lechon M.J., Castell J.V. (2007) Toxicol. In Vitro, **21**, 1247-1252.
107. Lin T., Pan K., Mordenti J., Pan L. (2007) J. Pharm. Sci., **96**, 2485-2493.
108. Smith D., Sadagopan N., Zientek M., Reddy A., Cohen L. (2007) J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci., **850**, 455-463.
109. Li X., Chen X., Li Q., Wang L., Zhong D. (2007) J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci., **852**, 128-137.
110. Yao M., Zhu M., Sinz M.W., Zhang H., Humphreys W.G., Rodrigues A.D., Dai R. (2007) J. Pharm. Biomed. Anal., **44**, 211-223.
111. Tolonen A., Petsalo A., Turpeinen M., Uusitalo J., Pelkonen O. (2007) J. Mass Spectrom., **42**, 960-966.
112. O'Donnell C.J., Grime K., Courtney P., Slee D., Riley R.J. (2007) Drug Metab. Dispos., **35**, 381-385.
113. Москалева Н.Е., Згода В.Г. (2012) Биомед. химия, **58**, 617-634. DOI: 10.18097/PBMC20125806617.
114. Yan Z., Caldwell G.W. (2014) in: Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods (Caldwell G.W., Yan Z., eds.), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 477-488.
115. Frei R.W., Watson I.D., Stewart M.J., Prescott L.F., King I.S., Brown L., Balali M., Adriaenssens P.I., Dixon P.F., Lukha P. et al. (1979) Proc. Anal. Div. Chem. Soc., **16**, 289-307.
116. Ma Y.-C., Kim H.-Y. (1997) J. Am. Soc. Mass Spectrom., **8**, 1010-1020.
117. Иванов А.С., Медведев А.Е. (2015) Биомед. химия, **61**, 231-238. DOI: 10.18097/PBMC20156102231.
118. Иванов А.С. (2012) Современные технологии в медицине, **4**, 142-153.
119. Englebienne P., Van Hoonacker A., Verhas M. (2003) Spectroscopy, **17**, 255-273.
120. Калужский Л.А., Гнеденко О.В., Гилеп А.А., Струшкевич Н.В., Шкель Т.В., Черновецкий М.А., Иванов А.С., Луцица А.В., Усанов С.А., Стоник В.А., Арчаков А.И. (2014) Биомед. химия, **60**, 528-537. DOI: 10.18097/PBMC20146005528.
121. Yablokov E., Florinskaya A., Medvedev A., Sergeev G., Strushkevich N., Luschik A., Shkel T., Haidukevich I., Gilep A., Usanov S. et al. (2017) Arch. Biochem. Biophys., **619**, 1015.
122. Иванов А.С., Згода В.Г., Арчаков А.И. (2011) Биоорган. химия, **37**, 8-21.
123. Иванов Ю.Д., Бухарина Н.С., Плешакова Т.О., Французов П.А., Крохин Н.В., Зиборов В.С., Арчаков А.И. (2011) Биофизика, **56**, 939-944.
124. Kuznetsov V.Y., Ivanov Y.D., Bykov V.A., Saunin S.A., Fedorov I.A., Lemeshko S.V., Hoa H.B., Archakov A.I. (2002) Proteomics, **2**, 1699-1705.
125. Kuznetsov V.Y., Ivanov Y.D., Archakov A.I. (2004) Proteomics, **4**, 2390-2396.
126. Shumyantseva V.V., Ivanov Y.D., Bistolas N., Scheller F.W., Archakov A.I., Wollenberger U. (2004) Anal. Chem., **76**, 6046-6052.
127. Schenkman J.B., Jansson I., Lvov Y., Rusling J.F., Boussaad S., Tao N.J. (2001) Arch. Biochem. Biophys., **385**, 78-87.
128. Nussio M.R., Voelcker N.H., Miners J.O., Lewis B.C., Sykes M.J., Shapter J.G. (2010) Chem. Phys. Lipids, **163**, 182-189.
129. Praporski S., Ng S.M., Nguyen A.D., Corbin C.J., Mechler A., Zheng J., Conley A.J., Martin L.L. (2009) J. Biol. Chem., **284**, 33224-33232.
130. Meyer U.A. (2004) Nat. Rev. Genet., **5**, 669-676.
131. Zanger U.M., Schwab M. (2013) Pharmacol. Ther., **138**, 103-141.
132. Sadee W., Wang D., Papp A.C., Pinsonneault J.K., Smith R.M., Moyer R.A., Johnson A.D. (2011) Clin. Pharmacol. Ther., **89**, 355-365.
133. Johansson I., Ingelman-Sundberg M. (2008) Cytogenet. Genome Res., **123**, 195-204.
134. Daly A.K. (2004) Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **369**, 133-140.
135. Roche Mol. Syst. Inc. AmpliChip CYP450 Test Vitr. diagnostic use. Branchbg. Roche Mol. Syst. Inc., 2005.
136. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Alexandrova S.A., Sokolov N.N., Schmid R.D., Bachmann T., Archakov A.I. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun., **263**, 678-680.
137. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Archakov A.I. (1999) Russ. Chem. Rev., **68**, 881-887.
138. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Schmid R.D., Archakov A.I. (2000) Biofizika, **45**, 1013-1018.
139. Schwaneberg U., Appel D., Schmitt J., Schmid R.D. (2000) J. Biotechnol., **84**, 249-257.
140. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Schmid R.D., Archakov A.I. (2002) Biosens. Bioelectron., **17**, 233-238.
141. Shalan H., Kato M., Cheruzel L. (2018) Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics, **1866**, 80-87.
142. Schneider E., Clark D.S. (2013) Biosens. Bioelectron., **39**, 1-13.
143. Shoji O., Watanabe, Y. (2014) JBIC J. Biol. Inorg. Chem., **19**, 529-539.
144. Hlavica P. (2009) Biotechnol. Adv., **27**(2), 103-121.
145. Scheller F., Renneberg R., Mohr P., Janig G.R., Ruckpaul K. (1976) FEBS Lett., **71**, 309-312.

146. Кузнецов Б.А., Местечкина Н.М., Изотов М.В., Карузина И.И., Карякин А.В., Арчаков А.И. (1979) Биохимия, **44**, 1569-1574.
147. Арчаков А.И., Кузнецов Б.А., Изотов М.В., Карузина И.И. (1981) Биофизика, **26**, 352-354.
148. Estabrook R.W., Faulkner K.M., Shet M.S., Fisher C.W. (1996) Methods Enzymol., **272**, 44-51.
149. Estabrook R.W., Shet M.S., Faulkner K., Fisher C.W. (1996) Endocr. Res., **22**, 665-671.
150. Sadeghi S.J., Fantuzzi A., Gilardi G. (2011) Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics, **1814**, 237-248.
151. Шумянцева В.В., Булко Т.В., Супрун Е.В., Кузиков А.В., Агафонова Л.Е., Арчаков А.И. (2015) Биомед. химия, **61**, 188-202. DOI: 10.18097/PBMC20156102188.
152. Hagen K.D., Gillan J.M., Im S.-C., Landefeld S., Mead G., Hiley M., Waskell L.A., Hill M.G., Udit A.K. (2013) J. Inorg. Biochem., **129**, 30-34.
153. Frank R., Klenner M., Azendorf R., Bartz M., Jahnke H.G., Robitzki A.A. (2017) Biosens. Bioelectron., **93**, 322-329.
154. Gray J.J. (2004) Curr. Opin. Struct. Biol., **14**, 110-115.
155. Shumyantseva V.V., Carrara S., Bavastrello V., Riley D.J., Bulko T.V., Skryabin K.G., Archakov A.I., Nicolini C. (2005) Biosens. Bioelectron., **21**, 217-222.
156. Carrara S., Baj-Rossi C., Boero C., De Micheli G. (2014) Electrochim. Acta, **128**, 102-112.
157. Cui D., Mi L., Xu X., Lu J., Qian J., Liu S. (2014) Langmuir, **30**, 11833-11840.
158. Mi L., He F., Jiang L., Shangguan L., Zhang X., Ding T., Liu A., Zhang Y., Liu S. (2017) J. Electroanal. Chem., **804**, 23-28.
159. Shukla A., Gillam E.M., Mitchell D.J., Bernhardt P.V. (2005) Electrochem. commun., **7**, 437-442.
160. Johnson D.L., Conley A.J., Martin L.L. (2006) J. Mol. Endocrinol., **36**, 349-359.
161. Rhieu S.Y., Ludwig D.R., Siu V.S., Palmore G.T.R. (2009) Electrochem. commun., **11**, 1857-1860.
162. Arduini F., Cinti S., Scognamiglio V., Moscone D., Palleschi G. (2017) Anal. Chim. Acta, **959**, 15-42.
163. Shiroma L.Y., Santhiago M., Gobbi A.L., Kubota L.T. (2012) Anal. Chim. Acta, **725**, 44-50.
164. Sugihara N., Ogoma Y., Abe K., Kondo Y., Akaike T. (1998) Polym. Adv. Technol., **9**, 307-313.
165. Alonso-Lomillo M.A., Gonzalo-Ruiz J., Domínguez-Renedo O., Muñoz F.J., Arcos-Martínez M.J. (2008) Biosens. Bioelectron., **23**, 1733-1737.
166. Holtmann D., Mangold K.-M., Schrader J. (2009) Biotechnol. Lett., **31**, 765-770.
167. Iwuoha E.I., Kane S., Ania C.O., Smyth M.R., Ortiz De Montellano P.R., Fuhr U. (2000) Electroanalysis, **12**, 980-986.
168. Sun P., Wu Y. (2013) Sensors Actuators B Chem., **178**, 113-118.
169. Lang D., Bocker R. (1995) J. Chromatogr. B. Biomed. Appl., **672**, 305-309.
170. Panicco P., Dodhia V.R., Fantuzzi A., Gilardi G. (2011) Anal. Chem., **83**, 2179-2186.
171. Fantuzzi A., Mak L.H., Capria E., Dodhia V., Panicco P., Collins S., Gilardi G. (2011) Anal. Chem., **83**, 3831-3839.
172. Sadeghi S.J., Ferrero S., Di Nardo G., Gilardi G. (2012) Bioelectrochemistry, **86**, 87-91.
173. Шумянцева В.В., Булко Т.В., Мишарин А.Ю., Арчаков А.А. (2011) Биомед. химия, **57**, 402-409. DOI: 10.18097/PBMC20115704402.
174. Kuzikov A.V., Dugin N.O., Stulov S.V., Shcherbinin D.S., Zharkova M.S., Tkachev Y.V., Timofeev V.P., Veselovsky A.V., Shumyantseva V.V., Misharin A.Y. (2014) Steroids, **88**, 66-71.
175. Kostin V.A., Zolottsev V.A., Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Shumyantseva V.V., Veselovsky A.V., Stulov S.V., Novikov R.A., Timofeev V.P., Misharin A.Y. (2016) Steroids, **115**, 114-122.
176. Стулов С.В., Дугин Н.О., Жаркова М.С., Щербинин Д.С., Кузиков А.В., Шумянцева В.В., Мишарин А.Ю., Веселовский А.В. (2016) Биомед. химия, **62**, 38-44. DOI: 10.18097/PBMC20166201038.
177. Zolottsev V.A., Tkachev Y.V., Latysheva A.S., Kostin V.A., Novikov R.A., Timofeev V.P., Morozevich G.E., Kuzikov A.V., Shumyantseva V.V., Misharin A.Y. (2018) Steroids, **129**, 24-34.
178. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Kuznetsova G.P., Lisitsa A.V., Ponomarenko E.A., Karuzina, I.I., Archakov A.I. (2007) Biochemistry (Moscow), **72**, 658-663.
179. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Archakov A.I. (2009) Biochemistry (Moscow), **74**, 438-444.
180. Sultana N., Schenkman J.B., Rusling J.F. (2005) J. Am. Chem. Soc., **127**, 13460-13461.
181. Mie Y., Suzuki M., Komatsu Y. (2009) J. Am. Chem. Soc., **131**, 6646-6647.
182. Mie Y., Tateyama E., Komatsu Y. (2014) Electrochim. Acta, **115**, 364-369.
183. Baj-Rossi C., Rezzonico Jost T., Cavallini A., Grassi F., De Micheli G., Carrara S. (2014) Biosens. Bioelectron., **53**, 283-287.
184. Walgama C., Nerimetla R., Materer N.F., Schildkraut D., Elman J.F., Krishnan S. (2015) Anal. Chem., **87**, 4712-4718.
185. Yoetz-Kopelman T., Porat-Ophir C., Shacham-Diamond Y., Freeman A. (2016) Sensors Actuators, B Chem., **223**, 392-399.
186. Simonov A.N., Holien J.K., Yeung J.C.I., Nguyen A.D., Corbin C.J., Zheng J., Kuznetsov V.L., Auchus R.J., Conley A.J., Bond A.M. et al. (2015) PLoS One, **10**, e0141252.
187. Gnedenko O.V., Yablokov E.O., Usanov S.A., Mukha D.V., Sergeev G.V., Bulko T.V., Kuzikov A.V., Moskaleva N.E., Shumyantseva V.V., Ivanov A.S. et al. (2014) Chem. Phys. Lett., **593**, 40-44.
188. Girhard M., Bakkes P.J., Mahmoud O., Urlacher V.B. (2015) in: Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry (Ortiz de Montellano P.R., ed.), Springer International Publishing, Cham, pp. 451-520.
189. van Beilen J.B., Duetz W.A., Schmid A., Witholt B. (2003) Trends Biotechnol., **21**, 170-177.
190. Gilardi G., Fantuzzi A. (2001) Trends Biotechnol., **19**, 468-476.
191. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Archakov A.I. (2005) J. Inorg. Biochem., **99**, 1051-1063.
192. Bistolas N., Wollenberger U., Jung C., Scheller F.W. (2005) Biosens. Bioelectron., **20**, 2408-2423.
193. Udit A.K., Gray H.B. (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun., **338**, 470-476.
194. Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Khatry Y., Zavialova M.G., Bernhardt R., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. (2016) Anal. Biochem., **513**, 28-35.
195. Daly A.K. (2015) Adv. Pharmacol., **74**, 85-111.
196. Kincaid J.R. (2000) in: Porphyrin Handbook (Kadish K.M., Smith K.M., Guillard R., eds.), Academic Press, New York, pp. 225-291.

Поступила: 07. 02. 2018.

Принята к печати: 24. 02. 2018.

METHODS FOR DETERMINING OF CYTOCHROME P450 ISOZYMES FUNCTIONAL ACTIVITY

A.V. Kuzikov^{1,2}, R.A. Masamrekh^{1,2}, A.I. Archakov^{1,2}, V.V. Shumyantseva^{1,2}

¹Institute of Biomedical Chemistry (IBMC),

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: v_shumyantseva@mail.ru

²Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russia

The review is dedicated to modern methods and technologies for determining of cytochrome P450 isozymes functional activity, such as absorbance and fluorescent spectroscopy, electron paramagnetic resonance (EPR), nuclear magnetic resonance (NMR), Raman, Mossbauer, and X-ray spectroscopy, surface plasmon resonance (SPR), atomic force microscopy (AFM). Methods of molecular genetic analysis were reviewed from personalized medicine point of view. The use of chromatate-mass-spectrometric methods for cytochrome P450-dependent catalytic reactions' products was discussed. The review covers modern electrochemical systems based on cytochrome P450 isozymes for their catalytic activity analysis, their use in practice and further development perspectives for experimental pharmacology, biotechnology and translational medicine.

Key words: cytochrome P450, substrates, inhibitors, electrochemical analysis, spectroscopy, mass-spectrometry