

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

### ЦИТОХРОМ P450 3A4 КАК ФЕРМЕНТ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ЛЕКАРСТВ: РОЛЬ МОДИФИКАЦИЙ СЕНСОРНЫХ СИСТЕМ В ЭЛЕКТРОКАТАЛИЗЕ И ЭЛЕКТРОАНАЛИЗЕ

А.В. Кузиков<sup>1,2</sup>, Т.В. Булко<sup>1</sup>, П.И. Королева<sup>1</sup>, Р.А. Масамрех<sup>1,2</sup>, С.С. Бабкина<sup>3</sup>, А.А. Гилев<sup>4</sup>, В.В. Шумянцева<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; \*эл. почта: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва

<sup>3</sup>МИРЭА – Российский технологический университет, Москва

<sup>4</sup>Институт биоорганической химии, Минск, Беларусь

Исследованы электроаналитические характеристики рекомбинантного цитохрома P450 3A4 (P450 3A4), иммобилизованного на поверхности печатных графитовых электродов, модифицированных многостеночными углеродными нанотрубками. Показана роль и установлено влияние модификации графитового рабочего электрода углеродными нанотрубками на электроаналитические параметры этого цитохрома. Оптимизированы условия его иммобилизации на полученных печатных графитовых электродах, модифицированных многостеночными углеродными нанотрубками. Определены электрохимические параметры процесса окисления и восстановления иона железа гема в составе фермента (полупотенциал ( $E^0$ )  $-0,35 \pm 0,01$  В (относительно хлоридсеребряного электрода сравнения, Ag/AgCl); электрохимическая константа скорости гетерогенного переноса электрона ( $k_s$ )  $0,57 \pm 0,04$  с<sup>-1</sup>; количество электроактивного P450 3A4 на модифицированном электроде  $\Gamma_0$ , моль/см<sup>2</sup>  $(2,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-10}$ . Установлен механизм функционирования этого электрохимического сенсора по принципу “protein film voltammetry” (вольтамперометрии, протекающей в плёнке белка на поверхности электрода). Проведено вольтамперометрическое исследование каталитической активности иммобилизованного P450 3A4 с целью разработки электроанализа лекарственных препаратов, представляющих собой субстраты данного гемопroteина, для разработки биосенсоров медицинского назначения. Исследованы электрокаталитические свойства рекомбинантного P450 3A4, иммобилизованного на модифицированных печатных графитовых электродах, по отношению к субстрату – антибиотик группы макролидов эритромицину. Показано, что модификация электродов играет решающую роль для исследований свойств цитохромов P450 в электрохимических исследованиях. Смарт-электроды могут выполнять функции как электроанализаторов для аналитических целей, так и электрокаталитаторов для исследования процессов биотрансформации и метаболических процессов. Электроды, модифицированные углеродными наноматериалами, применимы для аналитических целей при регистрации гемопroteинов. Электроды, модифицированные синтетическими мембраноподобными соединениями (например, дидодецилдиметиламмония бромидом), эффективны при проведении фермент-зависимого электрокатализа.

**Ключевые слова:** цитохром P450; углеродные нанотрубки; эритромицин; электрокатализ; электроаналитические параметры

**DOI:** 10.18097/PBMC20206601064

## ВВЕДЕНИЕ

Цитохромы P450 – гем-содержащие монооксигеназы, катализирующие широкий спектр химических реакций в организмах всех живых существ [1-3]. Эти ферменты участвуют в метаболизме ксенобиотиков, в том числе различных лекарственных соединений, катализируют метаболические превращения важнейших эндогенных соединений, являются фармакологическими молекулярными мишенями для лекарственных препаратов – регуляторов метаболизма [4]. Для исследования каталитической активности цитохромов P450 разработаны различные аналитические подходы: реконструированные системы на основе комплексов соответствующих изоформ цитохромов P450 с флавопротеином NADPH-зависимой цитохром P450 редуктазой, бакулосомы, содержащие рекомбинантные цитохромы P450 и их редокс-партнеры, микросомы человека или животных [5]. Исследование каталитической активности изоферментов

цитохрома P450 в системах *in vitro* сопряжено с реконструированием электрон-транспортной цепи, включающей использование редокс-партнерных белков, необходимых для восстановления иона железа Fe<sup>3+</sup> гема цитохрома P450 и осуществления каталитического процесса, со стадиями выделения продуктов ферментативной реакции и их анализом. Электроаналитические методы в исследовании цитохромов P450 позволяют использовать только гемопroteин, при этом электрод выполняет функции донора электронов, а также заменяет сервисные белки-партнеры [6-8]. Поиск более чувствительных преобразователей (таких как модифицированные наноматериалами электроды), аналитического сигнала, генерируемого биокатализатором (ферментом), может существенно улучшить и оптимизировать операционные параметры биосенсоров.

При разработке эффективного электрохимического процесса, связанного с транспортом электронов, и реализации электрокатализа важную роль играет модификация электрода для иммобилизации

цитохрома P450. В качестве модификаторов поверхности электродов используются различные вещества и наноматериалы: углеродные нанотрубки, графен, оксид графена, наночастицы металлов, липиды, синтетические мембраноподобные вещества, полимерные композиции [8-10]. Поиск новых материалов и методов модификации электродов для последующей иммобилизации изоферментов цитохрома P450 и исследования их (био)аналитических характеристик являются актуальной задачей при разработке электрохимических систем на основе этих ферментов, так как необходимо обеспечить условия для биосовместимости, сохранения каталитической активности цитохрома P450, а также повысить такие аналитические характеристики, как чувствительность и специфичность электрохимического анализа.

Цитохром P450 3A4 участвует в метаболизме более 50% существующих лекарственных препаратов [2, 4, 11]. Наличие объёмного активного центра у цитохрома P450 3A4 обеспечивает связывание субстратов, сильно различающихся по размерам, или нескольких низкомолекулярных субстратов одновременно [11, 12]. Поэтому создание систем высокопроизводительного аналитического скрининга, с помощью которых можно было бы определять субстратные или ингибиторные свойства лекарств по отношению к цитохрому P450 3A4, а также электрохимических методов анализа на их основе является актуальной задачей аналитической химии.

Цель данной работы – получение электродов, модифицированных многостеночными углеродными нанотрубками (УНТ), для исследования электроаналитических и электрокаталитических свойств цитохрома P450 3A4 и дальнейшей разработки метода анализа как различных изоформ цитохромов P450, так и его эффекторов (субстратов, ингибиторов, аллостерических регуляторов) на примере эритромицина.

## МЕТОДИКА

### *Реагенты и материалы*

Трёхконтактные печатные электроды с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлоридсеребряным электродом сравнения получены от “КолорЭлектроникс” (Россия). Диаметр рабочего электрода – 2 мм.

Рекомбинантный цитохром P450 3A4 человека, полученный согласно [13], использовали в виде 109 мкМ раствора в 550 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,2), содержащем 0,2% 3-(3-Холамидапропил) диметиламмоний-3-пропансульфоната, 1 мМ дитиотреитол и 20% глицерин. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически по образованию комплекса восстановленной формы с монооксидом углерода; коэффициент экстинкции  $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$  [14].

Остальные реактивы были получены от отечественных поставщиков. В работе были использованы все квалификации “ч”; дидодецилдиметиламмония бромид (ДДАБ) (“Sigma-Aldrich”, США), этанол (Россия); эритромицин

(чистота  $\geq 99\%$  “Acros Organics”, США), многостеночные углеродные нанотрубки (УНТ) с геометрическими параметрами: внешний диаметр 10–15 нм, внутренний диаметр 2–6 нм, длина 0,1–10 мкм (“Sigma-Aldrich”).

Дисперсия УНТ в хлороформе была получена при ультразвуковой дезинтеграции в течение 5 мин.

Для получения ферментных электродов использовали модифицированные ДДАБ или УНТ трёхконтактные печатные электроды с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлоридсеребряным электродом сравнения. На рабочий электрод наносили 2 мкл раствора ДДАБ в хлороформе или 2 мкл дисперсии УНТ в хлороформе. После испарения хлороформа наносили 2 мкл цитохрома P450 3A4, и ферментные электроды инкубировали 12 ч при 4°C в закрытой камере.

### *Оборудование*

Электрохимические исследования проводили с помощью потенциостата AUTOLAB 12 (“Metrohm Autolab”, Нидерланды), снабжённого программным обеспечением GPES (версия 4.9.7).

Все потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения Ag/AgCl.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Интеграция электроактивных белков или ферментов с поверхностью электрода и формирование условий для эффективного переноса электронов является фундаментальным вопросом современной электроаналитической химии [7, 8, 15]. Электрохимические системы на основе изоферментов цитохрома P450, иммобилизованных на электродах, используются для исследования как аналитических характеристик процессов окисления и восстановления гема как простетической группы, так и для анализа функциональной активности этого класса гемопротеинов [8]. В системах, часто использующих такие материалы, как полиионы, самоорганизующиеся монослои или липиды, белок образует на электроде стабильную тонкую пленку, в которой он сохраняет нативную конформацию [5]. Вольтамперометрия с использованием электродов на основе иммобилизованных ферментов, то есть ферментных электродов, имеет значительные преимущества перед вольтамперометрией в растворе так как: а) позволяет использовать безмедиаторные системы; б) устраняет диффузию молекул белка и загрязнение электродов денатурированным белком; в) для процедуры иммобилизации требуется минимальное количество белка. Электроаналитические характеристики редокс-ферментов регистрируются при иммобилизации  $10^{-12}$ – $10^{-9}$  моль/электрод, а количество электроактивного белка может составлять всего 1-10% иммобилизованного белка [7, 8].

Электроды, полученные методом трафаретной печати (screen-printed electrodes, печатные графитовые электроды, ПГЭ), широко используются для конструирования аналитических биосенсоров, так как трафаретная печать позволяет широко варьировать состав паст для получения

нанокompозитных материалов непосредственно при печати. ПГЭ позволяют работать в широком диапазоне рабочих потенциалов, использовать разнообразный спектр модификаций и методов получения химически модифицированной рабочей поверхности электрода [16, 17].

Активно развивающимся способом функционализации печатных электродов, позволяющим создавать гибридные и композитные электроды, является модификация углеродными наноматериалами, такими как углеродные нанотрубки, графен, оксид графена, допированные графены, фуллерены, наноалмазы; это позволяет как улучшить аналитические характеристики ферментных сенсорных систем, так и повысить их операционную стабильность [9, 18-25]. Углеродные материалы, в том числе и углеродные нанотрубки, привлекают интерес исследователей при разработке электрохимических сенсорных систем на основе цитохрома Р450 [24]. Функционализация электродной поверхности углеродными нанотрубками позволяет повысить чувствительность электрохимической биосенсорной системы на основе цитохрома Р450 и снизить предел определяемых концентраций субстратов этого гемопroteина по сравнению с немодифицированным электродом [25].

В настоящей работе был проведён сравнительный анализ электрохимических параметров и электрокаталитических свойств цитохрома Р450 3А4, иммобилизованного на поверхности ПГЭ, модифицированного многостеночными углеродными нанотрубками и ДДАБ. Электроаналитические свойства фермента, иммобилизованного на ПГЭ, модифицированном УНТ или ДДАБ, исследовали методом циклической вольтамперометрии в анаэробных условиях (рис. 1). В отсутствие кислорода как ко-субстрата цитохрома Р450 3А4 регистрируется

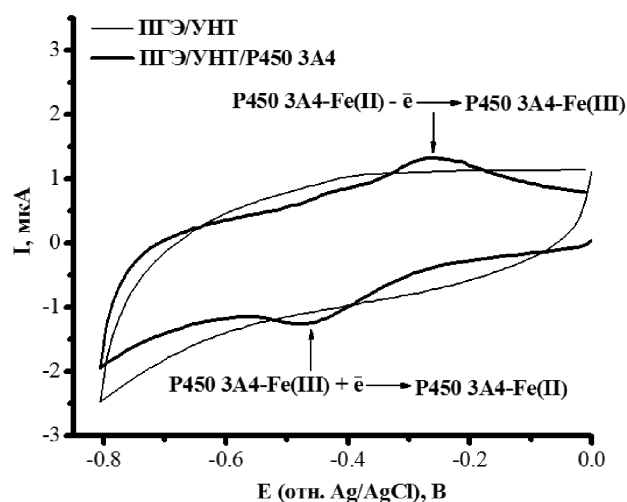
процесс переноса электронов, связанный с обратимой окислительно-восстановительной реакцией в соответствии со схемой (1):



Как видно из рисунка 1, циклические вольтамперограммы цитохрома Р450 3А4, иммобилизованного на ПГЭ, модифицированном УНТ (ПГЭ/УНТ), в анаэробных условиях характеризуются четкими пиками восстановления и окисления иона железа гема фермента в соответствии со схемой (1) при анодном потенциале -0,32 В и катодном потенциале -0,41 В. При скорости развертки потенциала 100 мВ/с разность между потенциалами пиков окисления и восстановления иона железа гема цитохрома Р450 3А4 составила  $201 \pm 14$  В, в то время как данная величина при той же скорости развертки потенциала в случае иммобилизованного цитохрома Р450 3А4 на ПГЭ, модифицированном ДДАБ (ПГЭ/ДДАБ), составила  $150 \pm 9$  мВ, что свидетельствует о более полном сопряжении этого гемопroteина с электродной поверхностью. Анализ зависимостей амплитуды токов пиков восстановления и окисления иона железа гема цитохрома Р450 3А4 от скорости развертки потенциала выявил линейную зависимость как для ПГЭ/ДДАБ, так и для УНТ/ПГЭ, что свидетельствует о протекании окислительно-восстановительной реакции гемопroteина на поверхности химически модифицированных электродов (protein film voltammetry). Для характеристики эффективности модификатора электрода рассчитывали такие аналитические характеристики, как поверхностная концентрация электроактивного белка  $\Gamma_0$ , (моль/см<sup>2</sup>) и доля (в %) электроактивного и иммобилизованного белка. Как видно из таблицы 1, электроды, модифицированные УНТ (ПГЭ/УНТ), имеют лучшие электроаналитические характеристики по сравнению с модификацией ДДАБ (ПГЭ/ДДАБ): константа скорости гетерогенного переноса электронов  $k_s = 0,57 \pm 0,04$  с<sup>-1</sup> для ПГЭ/УНТ, и  $0,51 \pm 0,03$  с<sup>-1</sup> для ПГЭ/ДДАБ. Поверхностная концентрация электроактивного белка  $\Gamma_0$ , (моль/см<sup>2</sup>) и доля (в %) электроактивного и иммобилизованного белка составила  $(2,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-10}$  моль/см<sup>2</sup> (45%) и  $(2,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$  моль/см<sup>2</sup> (5%) для ПГЭ/УНТ и ПГЭ/ДДАБ, соответственно. При иммобилизации фермента на электроде, модифицированном УНТ, поверхностная концентрация электроактивного вещества на электроде на порядок превышает это значение в случае использования ДДАБ как модификатора электрода.

В таблице 1 представлены сравнительные электроаналитические характеристики цитохрома Р450 3А4, иммобилизованного на ПГЭ, модифицированном УНТ или ДДАБ.

Диаметр белковой глобулы цитохрома Р450 3А4 составляет 4 нм [28]. Геометрическая площадь рабочего электрода – 0,0314 см<sup>2</sup>, расчётное количество электроактивных молекул Р450 3А4 в случае его иммобилизации на ПГЭ/УНТ – в среднем с  $4,9 \cdot 10^{12}$  молекул, а в случае его иммобилизации



**Рисунок 1.** Циклическая вольтамперограмма иммобилизованного цитохрома Р450 3А4 на ПГЭ (—), модифицированном 1 мкл 1 мг/мл УНТ в хлороформе, и фоновая кривая (—). Скорость развертки потенциала 100 мВ/с, диапазон потенциалов от 0 до -0,8 В (отн. Ag/AgCl). Измерения проводили в 1 мл электролитного буфера, рН 7,4, насыщенного аргоном (анаэробные условия).

Таблица 1. Электроаналитические характеристики цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на поверхности ПГЭ, модифицированного УНТ или ДДАБ, в анаэробных условиях

Электрохимическая система	$E^0$ (отн. Ag/AgCl), В	$k_s^*$ , $\text{с}^{-1}$	$\Gamma_0$ , моль/ $\text{см}^2$	% электроактивного белка
ПГЭ/УНТ/P450 3A4	$-0,35 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,04$	$(2,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-10}$	45
ПГЭ/ДДАБ/P450 3A4	$-0,30 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,03$	$(2,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$	5

Примечание: \* – значение константы скорости гетерогенного переноса электронов  $k_s$  рассчитывали по методу Лавирона при скорости развертки потенциала 100 мВ/с и  $\Delta E_p > 200$  мВ [28, 29]. Приведённые данные – средние значения  $\pm$  стандартные отклонения из 3-5 независимых экспериментов.

Таблица 2. Электрохимические характеристики P450 3A4, иммобилизованного на поверхности ПГЭ/УНТ или ПГЭ/ДДАБ, в аэробных условиях

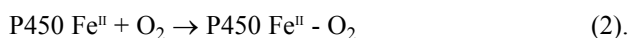
Электрохимическая система	$E_{pc}$ (отн. Ag/AgCl), В	$I_{pc}$ , мкА	Q, мкКл
ПГЭ/УНТ/P450 3A4	$-0,44 \pm 0,02$	$-1,11 \pm 0,33$	$5,0 \pm 1,1$
ПГЭ/ДДАБ/P450 3A4	$-0,39 \pm 0,01$	$-0,38 \pm 0,09$	$1,4 \pm 0,4$

Примечание. Приведённые данные – средние значения  $\pm$  стандартные отклонения из 3-5 независимых экспериментов. Q – заряд, рассчитанный путём интегрирования восстановительного пика в циклической вольтамперометрии, мкКл.

на ПГЭ/ДДАБ –  $5,1 \cdot 10^{11}$  молекул. Можно предположить, что распределение P450 3A4 на ПГЭ/УНТ является многослойным, а для ПГЭ/ДДАБ близким к монослою. Модификация углеродными наноматериалами (УНТ) более применима для аналитических целей и регистрации этого гемопротейна с помощью вольтамперометрии, регистрирующей некаталитический прямой перенос электронов в соответствии со схемами (1) и (2).

В анаэробных условиях значение полупотенциала цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на УНТ, смещено в катодную область по сравнению с полупотенциалом цитохрома P450 3A4 в случае иммобилизации на электроде с помощью ДДАБ.

Дальнейший сравнительный анализ электроаналитических свойств P450 3A4, иммобилизованного на ПГЭ/УНТ или ПГЭ/ДДАБ, проводили в аэробных условиях, так как кислород является косубстратом цитохромов P450. На рисунке 2 представлены циклические вольтамперограммы, соответствующие схеме (2), и зарегистрированные в аэробных условиях для P450 3A4, иммобилизованного на ПГЭ/УНТ или ПГЭ/ДДАБ.



Из рисунка 2 видно, что в аэробных условиях амплитуда пика катодного восстановления ( $E_{pc}$ ) P450 3A4 при иммобилизации фермента на ПГЭ/УНТ превышает соответствующую величину для ПГЭ/ДДАБ в три раза. Интегрирование площади пика под вольтамперной кривой позволяет рассчитать электроактивное покрытие Q (мкКл) восстановленной формы фермента в комплексе с кислородом как косубстратом цитохрома P450 3A4 для ПГЭ/УНТ или ПГЭ/ДДАБ.

В аэробных условиях потенциал пика восстановления иона железа гема P450 3A4 на ПГЭ/УНТ смещён в более отрицательную область по сравнению с потенциалом пика восстановления иона железа гема P450 3A4, иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ. Это указывает

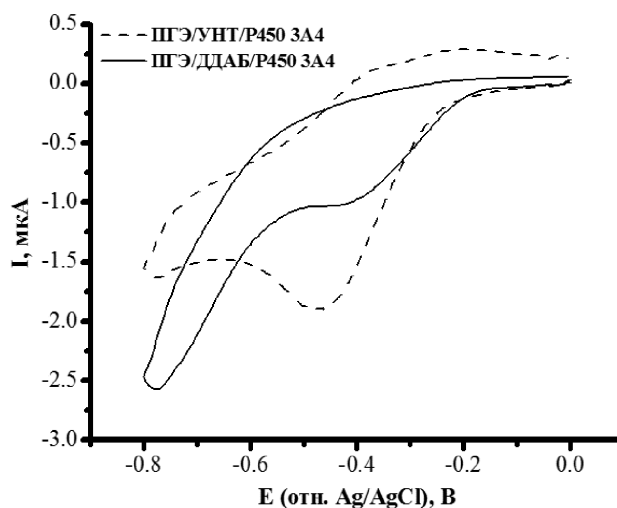
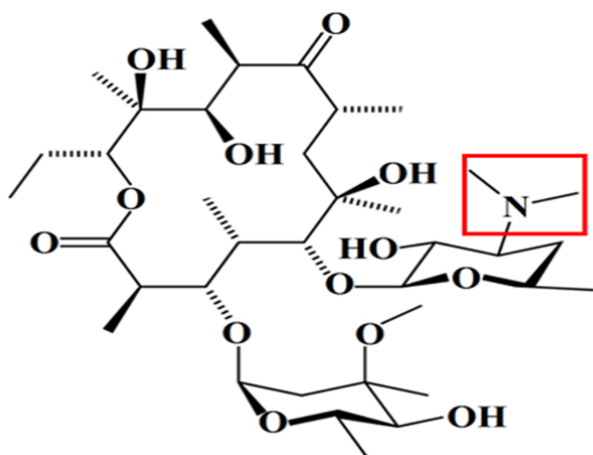


Рисунок 2. Циклические вольтамперограммы иммобилизованного P450 3A4 на ПГЭ/УНТ (---) или ПГЭ/ДДАБ (—). Параметры измерения: скорость развёртки потенциала 50 мВ/с, диапазон потенциалов от 0 до -0,8 В (отн. Ag/AgCl). Измерения проводили в 1 мл электролитного буфера, pH 7,4, в аэробных условиях.

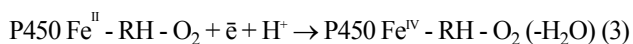
на то, что иммобилизация фермента на поверхности электрода с помощью липидной плёнки ДДАБ облегчает процесс восстановления иона железа гема P450 3A4 по сравнению с процессом восстановления гемопротейна при иммобилизации с помощью УНТ. В таблице 2 представлены сравнительные электрохимические характеристики P450 3A4 в аэробных условиях.

Электрокаталитические свойства P450 3A4, иммобилизованного на ПГЭ/УНТ или ПГЭ/ДДАБ, исследовали по отношению к субстрату эритромицину – бактериостатическому антибиотику из группы макролидов (рис. 3). Эритромицин, оказывающий бактериостатическое действие, активен в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, в связи с чем широко используется в антибактериальной терапии.



**Рисунок 3.** Структура молекулы эритромицина. В квадрате обозначена группа, подвергающаяся N-деметилованию, катализируемому цитохромом Р450 3А4.

В присутствии субстратов (RH как органического субстрата, эритромицина и кислорода) протекают реакции, описываемые схемами (3) и (4).



При иммобилизации с помощью УНТ в присутствии 100 мкМ эритромицина амплитуда пика восстановления иона железа гема Р450 3А4, соответствующая проявлению каталитических свойств фермента, увеличивается на 30±9%, а эффективность электрокатализа, выраженная как соотношение тока в присутствии эритромицина  $I_{\text{Er}}$  и в присутствии кислорода  $I_{\text{O}_2}$  ( $I_{\text{Er}}/I_{\text{O}_2}$ ), составляет 1,3±0,09. Аналитическая чувствительность ферментного ПГЭ/УНТ по отношению к эритромицину составляет 0,003 А/М (S/N=3). Потенциал начала катализа ( $E_{\text{onset}}$ ) составляет -0,25 В, а потенциал катализа ( $E_{\text{cat}}$ ) составляет -0,48 В (рис. 4А). При иммобилизации

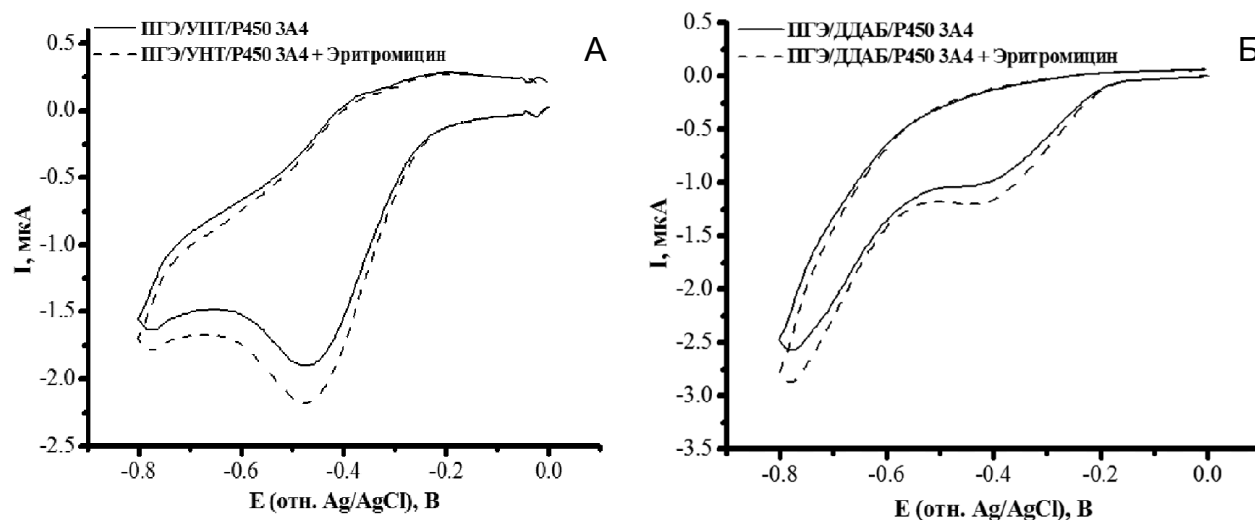
фермента с помощью ДДАБ амплитуда каталитического тока возрастает на 10±6% (рис. 3), а эффективность катализа составляет  $I_{\text{Er}}/I_{\text{O}_2}=1,14\pm0,06$ .  $E_{\text{onset}}$  составляет -0,22 В, а  $E_{\text{cat}}$  составляет -0,40 В. Аналитическая чувствительность ферментного ПГЭ/ДДАБ по отношению к эритромицину составляет 0,0004 А/М (S/N=3) (рис. 4Б).

В связи с этим, ферментные электрохимические системы на основе УНТ могут быть использованы как аналитические инструменты для высокопроизводительного поиска субстратов и/или ингибиторов этого класса гемопротеинов среди массива химических соединений, полученных *de novo*, для формирования базы новых потенциальных лекарственных средств, взаимодействующих с ферментами суперсемейства цитохромов Р450.

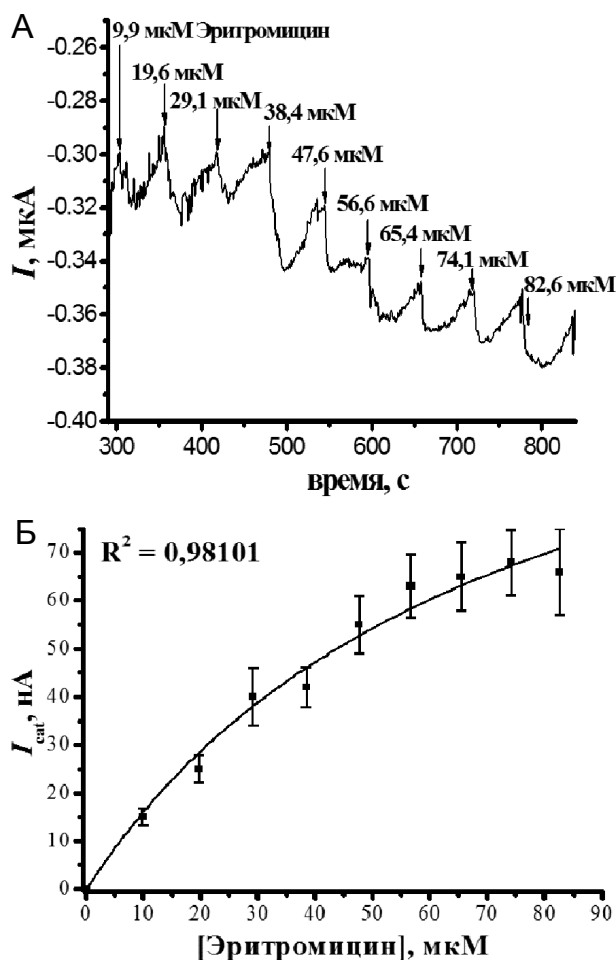
С помощью электрохимической формы уравнения Михаэлиса-Ментен (5) из зависимостей каталитического тока от концентрации субстратов были определены электрокаталитические параметры цитохрома Р450 3А4, иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ [8, 29].

$$I_{\text{cat}} = \frac{I_{\text{cat max}} \times [\text{S}]}{K_{\text{M}}^{\text{app}} + [\text{S}]} \quad (5).$$

Для системы на ПГЭ/ДДАБ/Р450 3А4 константа Михаэлиса  $K_{\text{M}}$  была определена как 25±8 мкМ (рис. 5Б). Для системы ПГЭ/УНТ/Р450 3А4 не удалось провести амперометрическое титрование, вероятно, вследствие инактивации гемопротеина на поверхности УНТ при концентрационно-зависимом титровании субстратом. ПГЭ/ДДАБ/Р450 3А4 электрохимические системы более предпочтительны для исследования электрокинетических параметров цитохром Р450-зависимых систем, а также для разработки биореакторов с целью наработки продуктов биотрансформации этих ферментативных процессов.



**Рисунок 4.** А. Циклические вольтамперограммы иммобилизованного Р450 3А4 на ПГЭ/УНТ (—), и в присутствии 100 мкМ эритромицина (---). Б. Циклические вольтамперограммы иммобилизованного Р450 3А4 на ПГЭ/ДДАБ (—), и в присутствии 100 мкМ эритромицина (---).



**Рисунок 5.** А. Амперометрическое титрование 1 мМ эритромицином ПГЭ/ДДАБ/Р450 3А4. Б. Зависимость каталитического тока Р450 3А4 от концентрации эритромицина. Параметры измерения: скорость развёртки потенциала 50 мВ/с, диапазон потенциалов от 0 до -0,8 В (отн. Ag/AgCl). Измерения проводили в 1 мл электролитного буфера, рН 7,4, аэробные условия. Эритромицин был растворён в этаноле, концентрация которого в электрохимической системе не превышала 1% по объёму.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммобилизация цитохрома Р450 3А4 на электродах, модифицированных УНТ, приводит к увеличению количества электроактивного вещества на электроде, однако иммобилизация фермента на поверхности электрода с помощью мембраноподобной плёнки ДДАБ энергетически более выгодна, так как способствует протеканию окислительно-восстановительного процесса иона железа гема цитохрома Р450 3А4, о чём свидетельствует смещение  $E^0$ ,  $E_{pc}$ ,  $E_{onset}$ ,  $E_{cat}$  (рис. 2, рис. 4А,Б) в область положительных потенциалов. Таким образом, сравнительный анализ электроаналитических свойств Р450 3А4, иммобилизованного на ПГЭ, модифицированном УНТ или ДДАБ, выявил, что электрокаталитическая активность Р450 3А4 по отношению к субстрату эритромицину выше при иммобилизации фермента в плёнку ДДАБ.

Полученные результаты указывают на то, что углеродные наноматериалы для модификации электродов повышают аналитическую чувствительность системы и количество электроактивного белка на электроде (табл. 1), однако для проявления каталитической активности мембранных форм цитохрома Р450 необходимо создание соответствующего микроокружения фермента с помощью природных липидов или липидоподобных синтетических соединений, таких как ДДАБ. Модификации с помощью углеродных наноматериалов могут быть использованы для аналитического определения цитохромов Р450 в биообъектах, таких как микросомы, клетки, ткани, бакулосомы, биологические жидкости; для характеристики электроаналитических параметров этих сложных гемопротеинов при исследовании новых изоформ белка, при получении мутантных форм белка. Однако для исследования каталитических функций и кинетических параметров предпочтительно использование биосовместимых композиционных материалов для модификации электродов, сохраняющих каталитическую активность этого уникального класса гемопротеинов. В работе на примере эритромицина показано, что ферментные электрохимические системы на основе УНТ могут быть использованы для исследования субстрат/ингибиторного потенциала, а также эффективного поиска и определения субстратов и/или ингибиторов этого класса гемопротеинов среди новых химических соединений – потенциальных лекарственных препаратов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-04-00374.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Nebert D., Russel D. (2002) Lancet, **360**, 1155-1162.
2. Hannemann F., Bichet A., Ewen K.M., Bernhardt R. (2007) Biochim. Biophys. Acta, **1770**, 330-344.
3. Guengerich F.P. (2015) in: Cytochrome P450. Structure, mechanism, and biochemistry (Ortiz de Montellano P.R., ed.) Springer-Verlag US, San Francisco, pp. 377-530.
4. Hrycak E.G., Bandiera S.M. (2015) Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450. Springer International Publishing.
5. Кузиков А.В., Масамрех Р.А., Арчаков А.И., Шумянцева В.В. (2018) Биомедицинская химия, **64**, 149-168. [Kuzikov A.V., Masamreh R.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. (2018) Biomeditsinskaya Khimiya, **64**, 149-168.]

6. Sadeghi S.J., Fantuzzi A., Gilardi G. (2011) Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics, **1814**, 237-248.
7. Schneider E., Clark D. (2013) Biosens. Bioelectron., **39**, 1-13.
8. Shumyantseva V.V., Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Bulko T.V., Archakov A.I. (2018) Biosens. Bioelectron., **121**, 192-204.
9. 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.
10. Sharma S., Singh N., Tomar V., Chandra R. (2018) Biosens. Bioelectron., **107**, 76-93.
11. Polic V., Auclair K. (2017) Bioconjugate Chem., **28**, 885-889.
12. Yang Y., Wong S.E., Lightstone F.C. (2014) PLoS One, **9**, e87058. DOI:10.1371/journal.pone.0087058
13. Pechurskaya T.A., Lukashovich O.P., Gilep A.A., Usanov S.A. (2008) Biochemistry (Moscow), **73**, 806-811.
14. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 2379-2385.
15. Willner I., Katz E. (2000) Angew. Chem. Int Ed., **39**, 1180-1218.
16. Arduini F., Micheli L., Moscone D., Palleschi G., Piermarini S., Francesco Ricci F., Volpe G. (2016) Trends Anal. Chem., **79**, 114-126.
17. Li M., Li D.-W., Xiu G., Long Y.-T. (2017) Curr. Opin. Electrochem., **3**, 137-143.
18. Liu J., Liu Z., Barrow C.J., Yang W. (2015) Anal. Chim. Acta., **859**, 1-19.
19. Liu J., Liu Z., Barrow C.J., Yang W. (2015) Sens. Actuators B Chem., **219**, 361-369.
20. Sigolaeva L.V., Bulko T.V., Kozin M.S., Zhang W., Köhler M., Romanenko I., Yuan J., Schacher F.H., Pergushov D.V., Shumyantseva V.V. (2019) Polymer, **168**, 95-103.
21. Guo S., Wen D., Zhai Y., Dong S., Wang E. (2011) Biosens. Bioelectron., **26**, 3475-3481.
22. Baig N., Sajid M., Saleh T.A. (2019) Trends Anal. Chem., **111**, 47-61.
23. Ziyatdinova G.K., Zakharova S.P., Ziganshina E.R., Budnikov H.C. (2019) J. Anal. Chem., **74**, 816-824.
24. Carrara S., Shumyantseva V.V., Archakov A.I., Samori B. (2008) Biosens. Bioelectron., **24**, 148-150.
25. Carrara S., Baj-Rossi C., Boero C., De Micheli G. (2014) Electrochim. Acta, **128**, 102-112.
26. Laviron E. (1979) J. Electroanal. Chem., **101**, 19-28.
27. Bard A.J., Faulkner L.R. (1980) Electrochemical methods: fundamentals and applications. John Wiley & Sons.
28. Yano J.K., Wester M.R., Schoch G.A., Griffin K.J., Stout C.D., Johnson E.F. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 38091-38094.
29. Wang J. (2006) Analytical electrochemistry, 3d edition. Wiley-VCH.

Поступила в редакцию: 23. 01. 2020.  
После доработки: 10. 02. 2020.  
Принята к печати: 12. 02. 2020.

# ELECTROANALYTICAL AND ELECTROCATALYTICAL CHARACTERISTICS OF CYTOCHROME P450 3A4 USING ELECTRODES MODIFIED WITH NANOCOMPOSITE CARBON NANOMATERIALS

A.V. Kuzikov<sup>1,2</sup>, T.V. Bulko<sup>1</sup>, P.I. Koroleva<sup>1</sup>, R.A. Masamrekh<sup>1,2</sup>, S.S. Babkina<sup>3</sup>, A.A. Gilep<sup>4</sup>, V.V. Shumyantseva<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

<sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Russian Technological University, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, Minsk, Belarus

The electroanalytical characteristics of recombinant cytochrome P450 3A4 (P450 3A4) immobilized on the surface of screen-printed graphite electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes have been studied. The role and the influence of graphite working electrode modification with carbon nanotubes on electroanalytical characteristics of cytochrome P450 3A4 have been demonstrated. The conditions for the immobilization of cytochrome P450 3A4 on the obtained screen-printed graphite electrodes modified with carbon multi-walled nanotubes have been optimized. The electrochemical parameters of the oxidation and reduction of the heme iron of the enzyme have been estimated. The midpoint potential  $E^0$  was  $-0.35 \pm 0.01$  V vs Ag/AgCl; the calculated heterogeneous electron transfer rate constant  $k_s$  was  $0.57 \pm 0.04$  s<sup>-1</sup>; the amount of electroactive cytochrome P450 3A4 on the electrode  $\Gamma_0$  was determined as  $(2.6 \pm 0.6) \cdot 10^{-10}$  mol/cm<sup>2</sup>. The functioning mechanism of P450 3A4-based electrochemical sensor followed the "protein film voltammetry". In order to develop electrochemical analysis of drugs being substrates of that hemoprotein and respective medical biosensors the voltammetric study of catalytic activity of immobilized cytochrome P450 3A4 was carried out. Electrocatalytic properties of cytochrome P450 3A4, immobilized on modified screen-printed graphite electrodes, has been investigated using erythromycin (macrolide antibiotics). It has been shown that the modification of electrodes plays a decisive role for the study of the properties of cytochromes P450 in electrochemical investigations. Smart electrodes can serve as sensors for analytical purposes, as well as electrocatalysts for the study of biotransformation processes and metabolic processes. Electrodes modified with carbon nanomaterials are applicable for analytical purposes in the registration of hemoproteins. Electrodes modified with synthetic membrane-like compounds (e.g. didodecyldimethylammonium bromide) are effective in enzyme-dependent electrocatalysis.

**Key words:** cytochrome P450; carbon nanotubes; erythromycin; electrocatalysis; electroanalytical parameters

**Funding.** This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 18-04-00374).

Received: 23.01.2020, revised: 10.02.2020, accepted: 12.02.2020.