

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.015.1; 577.15; 543.94

© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА ЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМА P450 3A4

В.В. Шумянцева^{1}, А.А. Махова¹, Т.В. Булко¹, Е.В. Ших², В.Г. Кукуес²,
С.А. Усанов³, А.И. Арчаков¹*

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
“Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича” Российской академии медицинских наук
(ФГБУ “ИБМХ” РАМН), ул. Погодинская, д. 10, 119121 Москва;
тел.: 7 (499) 246-58-20, факс: 7 (499) 245-08-57;
эл. почта: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

²ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва;

³Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Электрохимический анализ каталитической активности цитохрома P450 3A4 показал, что витамины С, А и Е влияют на восстановление цитохрома P450 3A4. Полученные данные позволяют предположить возможность взаимного влияния витаминов и лекарственных препаратов, метаболизируемых цитохромом P450 3A4, при проведении комплексной терапии. Эти витамины проявляют антиоксидантные свойства, что приводит к повышению катодного тока, соответствующего восстановлению гема этого функционально значимого гемопротейна. Аскорбиновая кислота в концентрации 0,028-0,56 мМ стимулирует катодный восстановительный пик (электрохимический сигнал) цитохрома P450 3A4. В присутствии диклофенака – типичного субстрата цитохрома P450 3A4 – наблюдается рост каталитического тока, свидетельствующий об электрокатализе и стимулирующем действии аскорбиновой кислоты. В присутствии витаминов А и Е также регистрируется дозозависимое (в диапазоне 10-100 мкМ) увеличение каталитического тока цитохрома P450 3A4: максимальное увеличение составляет 229±20% для 100 мкМ витамина А, и 162±10% для 100 мкМ витамина Е. В отличие от витамина А, витамин Е в присутствии ингибитора итраконазола не даёт существенного увеличения каталитического тока, что может указывать на проявление субстратных свойств витамином Е. Электрохимический подход для анализа каталитической активности цитохрома P450 3A4 и исследования влияния биологически активных соединений на электрокатализ является чувствительным и эффективным сенсорным подходом, позволяющим использовать низкие концентрации белка на электроде (до 10⁻¹⁵ моль/электрод), проводить анализ без участия белков-партнеров и выявлять взаимодействие лекарственных препаратов в доклинических экспериментах.

Ключевые слова: Цитохром P450 3A4, диклофенак, антиоксиданты, электрохимия, ферментные электроды, витамины А, С, Е, взаимодействие.

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. Со свободными радикалами в организме связывают один из наиболее важных механизмов повреждающего воздействия на клетки [1]. Чаще всего источником свободных радикалов в организме служит кислород, широко используемый организмом при дыхании. В обычном состоянии его ядро окружено 8 спаренными электронами. Свободные радикалы образуются в организме в результате множества окислительно-восстановительных реакций. Регулирующие функции свободных радикалов у здорового человека могут трансформироваться в их повреждающее влияние, прежде всего при изменении их количества. Пытаясь возместить потерю электрона, свободный радикал отбирает его, например, у молекулы, входящей в состав бислоя клеточной мембраны, превращая её в новый свободный радикал, так называемый вторичный. В дальнейшем возникает патологическая цепная реакция, которая нарушает целостность клеток и вызывает их гибель. Эта реакция носит название свободнорадикального каскада и представляет собой окислительный (оксидативный) стресс [2-4]. Разрушительное действие свободных радикалов проявляется в ускорении процессов старения организма, провоцировании повреждающего воздействия на различные ткани и системы организма, включая клетки мозга, сердца, кроветворной, иммунной системы и многих других. В настоящее время доказана роль свободнорадикального окисления в патогенезе таких заболеваний, как атеросклероз [5, 6], болезнь Альцгеймера, нарушение мозгового кровообращения, ангиопатии при сахарном диабете, дегенеративные заболевания суставов и позвоночника, катаракты, некоторые виды злокачественных опухолей, системных заболеваний, онкологическая патология [7]. В крупных эпидемиологических исследованиях была установлена связь между низким содержанием естественных антиоксидантов в организме и достоверным увеличением риска сердечнососудистых заболеваний [5]. Постоянное образование свободных радикалов в процессе старения человека приводит к снижению функциональной активности его органов.

Антиоксидантом принято называть химическое вещество, способное в низких концентрациях уменьшить или полностью прекратить свободнорадикальное окисление в тканях [2]. Антиоксидант нейтрализует свободный радикал, отдавая свой собственный электрон и прерывая тем самым цепную реакцию свободнорадикального каскада. Взаимодействуя со свободными радикалами, антиоксиданты сами становятся окисленными, так называемыми третичными радикалами, и уже не могут в дальнейшем выполнять свои функции, поэтому возникает необходимость постоянного пополнения запаса антиоксидантов в организме [2, 3].

В этом плане одной из наиболее перспективных групп является природная система антиоксидантов, представленная прежде всего витаминами – токоферолом, витамином А и каротиноидами, аскорбиновой кислотой, – вследствие своей доступности, распространенности в природе, лучшей изученности и биосовместимости с организмом человека. Витамины в настоящее время наиболее часто включаются в состав комплексной терапии целого ряда заболеваний в качестве антиоксидантов [3, 8, 9].

Однако, в ряде экспериментальных и клинических исследований продемонстрирована возможность витаминов выступать в качестве средств регуляции биотрансформации и фармакологического действия лекарственных веществ, путем изменения активности ферментов метаболизма ксенобиотиков, в том числе системы цитохрома P450 [10-12].

Цитохромы P450 играют огромную роль в метаболизме лекарственных препаратов. Цитохром P450 3A4 является наиболее функционально значимым среди цитохромов P450, так как метаболизирует 637 субстратов и участвует в метаболизме 50% применяемых лекарственных препаратов [13-15].

Для исследования каталитической активности цитохромов P450 могут быть применены электрохимические системы [16, 17]. Ранее электрохимическими методами подтверждено влияние витаминов группы В (тиамина – витамин В1, рибофлавина – витамин В2, пиридоксина – витамин В6) на монооксигеназную активность цитохромов P450 [18, 19]. Фармакодинамические и фармакокинетические данные показали, что нагрузочные дозы витаминов группы В позволяют при одновременном назначении снизить суточную дозу диклофенака не уменьшая его анальгетического эффекта.

Для исследования электроаналитических характеристик используют вольтамперные отклики электродов, регистрируемые с помощью цикловольтамперометрии и вольтамперометрического анализа (квадратно-волновой и дифференциальной импульсной вольтамперометрии). Субстраты соответствующих форм цитохромов P450 вызывают существенное повышение каталитического тока при потенциале восстановления цитохрома P450, а ингибиторы не изменяют или снижают максимальные амплитуды токов восстановления этого гемопroteина [16].

Механизм каталитического гидроксирования субстратов цитохромов P450 сложен, включает несколько стадий и сопровождается генерированием пероксида водорода и активных форм кислорода (супероксид анион-радикала, гидросупероксида, гидропероксида), которые образуются за счёт неполного сопряжения, т.е. несоответствия стехиометрии реакционного цикла (схема 1) [20]. В каталитическом цикле цитохрома P450 один из атомов кислорода расходуется на окисление органической молекулы, а второй восстанавливается до воды за счёт редокс-эквивалентов NADPH или NADH. Часть электронов расходуется на восстановление кислорода, не сопровождающееся конверсией субстрата.

Это явление получило название разобщения. Известно, что цитохромы P450 микросом печени не окисляют ни один из известных субстратов с полным сопряжением. Часть редокс-эквивалентов NADPH расходуется в побочных оксидазных реакциях [21].



где RH – субстрат цитохрома P450, ROH – продукт монооксигеназной реакции, катализируемой цитохромом P450 (гидроксированный субстрат).

Активные формы кислорода (АФК) могут взаимодействовать с цитохромом P450, вызывая инактивацию фермента [20-23]. В клетках активные формы кислорода, генерируемые цитохромом P450, влияют и на уровень секреции амфирегулина, на внутриклеточную адгезионную молекулу 1, на матриксную металлопротеазу 2, на факторы роста (PDGF и васкулярный эндотелиальный фактор) а также на секрецию белка CD14 [24]. Направленная регуляция каталитического цикла цитохрома P450 может приводить как к снижению скорости метаболизма лекарственных препаратов, так и к активации ферментативного гидроксирования субстратов

[20, 25]. Это особенно важно в случае выявления пониженной экспрессии определенной формы цитохрома P450. Антиоксиданты снижают уровень АФК, так как являются ловушками кислородных радикалов.

В настоящей работе влияние витаминов-антиоксидантов С, А, и Е на каталитическую активность цитохрома P450 3A4 было исследовано электрохимическими методами. Показано концентрационно-зависимое стимулирующее влияние антиоксидантов на электрокатализ цитохрома P450 3A4. Витамин Е проявляет субстратные свойства, так как регистрируется дополнительный рост каталитического тока в присутствии аскорбиновой кислоты.

МЕТОДИКА.

Электрохимические измерения проводили с помощью потенциостата PGSTAT12 Autolab ("Eco Chemie", Нидерланды), снабжённого программным обеспечением GPES. Все измерения проводили при комнатной температуре. Электрохимические исследования цитохрома P450 3A4 проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 0,05 М NaCl, pH 7,4. В работе использовали трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО НПП "ЭЛКОМ", Россия, <http://www.elcom-moscow.ru>); с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами (графитовая паста для печати фирмы "Achison", США), и хлорсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода 2 мм. Все потенциалы приведены относительно хлорсеребряного Ag/AgCl электрода сравнения.

Цикловольтамперограммы (CV) регистрировали при скорости развёртки от 10 до 100 мВ/с. Параметры, используемые при исследовании квадратно-волновой вольтамперометрии: (КВВА, восстановление, аэробные условия) начальный потенциал 100 мВ, конечный потенциал -600 мВ, шаг потенциала 5 мВ, амплитуда 20 мВ, частота от 10 до 100 Гц.

Реагенты. В работе использовали следующие реактивы: дидодецилдиметиламмоний бромид (DDAB), $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, боргидрид натрия – фирмы "Sigma-Aldrich", (США), диклофенак натрия (субстанция) ("Вертекс", Россия) 50 мг/мл в ампулах, витамин А (ретинол ацетат, 0,1 М) и витамин Е (токоферол ацетат, 0,1 М), фирма "DSM" (США).

В электрохимических экспериментах использовали свежеприготовленные растворы 10 мМ диклофенака в воде, 0,28 М аскорбиновую кислоту, 0,1 М ретинол ацетат, 0,1 М токоферол ацетат.

Коллоидный раствор золота, стабилизированный DDAB в хлороформе, был охарактеризован спектрально: $\lambda_{\text{max}} = 520$ нм [26].

Рекомбинантный P450 3A4 (165 мкМ) был получен в Институте Биоорганической химии (Минск, Республика Беларусь). Концентрацию цитохрома P450 3A4 определяли по образованию комплекса восстановленной формы с оксидом углерода, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{450} = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

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

Влияние антиоксидантов на восстановительный ток цитохрома P450 3A4 проводили методом КВВА по регистрации максимальной высоты катодного пика с коррекцией по базовой линии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Регуляция активности ферментов, и в частности, цитохромов P450, экзогенными веществами может

осуществляться различными механизмами: аллостерической регуляцией, торможением ферментативной реакции ингибиторами, влиянием детергентов [20, 25, 27]. Витамин С, витамин А и витамин Е, обладающие антиоксидантными свойствами, влияют на каталитическую активность цитохрома Р450 3А4. Так как восстановление гема цитохрома Р450 является основной стадией в катализе и сопровождается генерированием АФК [21, 28], вещества, проявляющие антиоксидантные свойства, могут влиять на каталитические функции этого гемопротейна. В электрохимических системах при восстановлении цитохромов Р450 также генерируются активные формы кислорода, и можно ожидать влияния веществ-“ловушек” АФК на электрокатализ. Регистрацию электровосстановления проводили электрохимическими методами (циклическая и квадратно-волновая вольтамперометрия). Аскорбиновая кислота в диапазоне концентраций 0,028-1,12 мМ стимулирует катодный восстановительный пик (электрохимический сигнал) цитохрома Р450 3А4 (рис. 1А). В присутствии диклофенака – типичного субстрата цитохрома Р450 3А4 – также наблюдается рост каталитического тока, свидетельствующий об электрокатализе по отношению к диклофенаку и стимулирующем действии аскорбиновой кислоты (рис. 1А и 1Б): $135 \pm 10\%$ и $155 \pm 7\%$, соответственно. В системе только цитохром Р450 3А4, диклофенак дает увеличение катодного каталитического тока на $128 \pm 10\%$. Однако, в концентрациях выше 1,12 мМ витамин С не проявляет заметного стимулирующего действия, не снижая при этом эффективность электрокатализа по отношению к диклофенаку (72% для 1,68 мМ витамина С и 101% в присутствии диклофенака).

Ретинол обратимо окисляется ретинолдегидрогеназой с образованием ретиналя. Далее, ретиноль необратимо окисляется до *транс*-ретиноевой кислоты ретиноль дегидрогеназой и далее окисляется семейством цитохромов Р450, (в основном СYP26) в тканях печени [29, 30]. Эти данные свидетельствуют об отсутствии субстратных свойств витамина А по отношению к цитохромам Р450. По нашим данным, витамин А (ретинол ацетат) проявляет концентрационно-зависимое влияние на электровосстановление цитохрома Р450 3А4. В концентрации 10-100 мкМ витамин А проявляет стимулирующий эффект: катодный пик возрастает пропорционально концентрации витамина А и достигает $229 \pm 10\%$ (рис. 2А и 2Б). Диклофенак в присутствии 100 мкМ витамина А не дает “дополнительный” рост каталитического тока: значение каталитического тока сопоставимо с увеличением за счёт витамина А и происходит на $230 \pm 10\%$. Витамин А в диапазоне концентраций от 0,1 мМ до 1 мМ не влияет на значение восстановительного катодного тока цитохрома Р450 3А4. Однако, диклофенак проявляет пониженную активность в присутствии 1 мМ витамина А (увеличение катодного пика происходит на $109\% \pm 3\%$).

Витамин Е (10-100 мкМ) также проявляет стимулирующий эффект: катодный пик возрастает пропорционально концентрации витамина Е, и при 100 мкМ концентрации витамина Е восстановительный пик цитохрома Р450 3А4 увеличивается на $162 \pm 10\%$ (рис. 2). Диклофенак, как и при добавлении витамина А, не дает увеличение каталитического тока: он сохраняется на уровне системы, содержащей витамин Е: $169 \pm 10\%$. Витамин Е в диапазоне концентраций 0,1-1 мМ более эффективно, чем витамин А, стимулирует рост восстановительного катодного пика цитохрома Р450 3А4: $119 \pm 10\%$, а диклофенак в присутствии высоких концентраций витамина Е не проявляет субстратные свойства (увеличение тока на $121 \pm 5\%$). В этом действие витамина С и витаминов А и Е различаются.

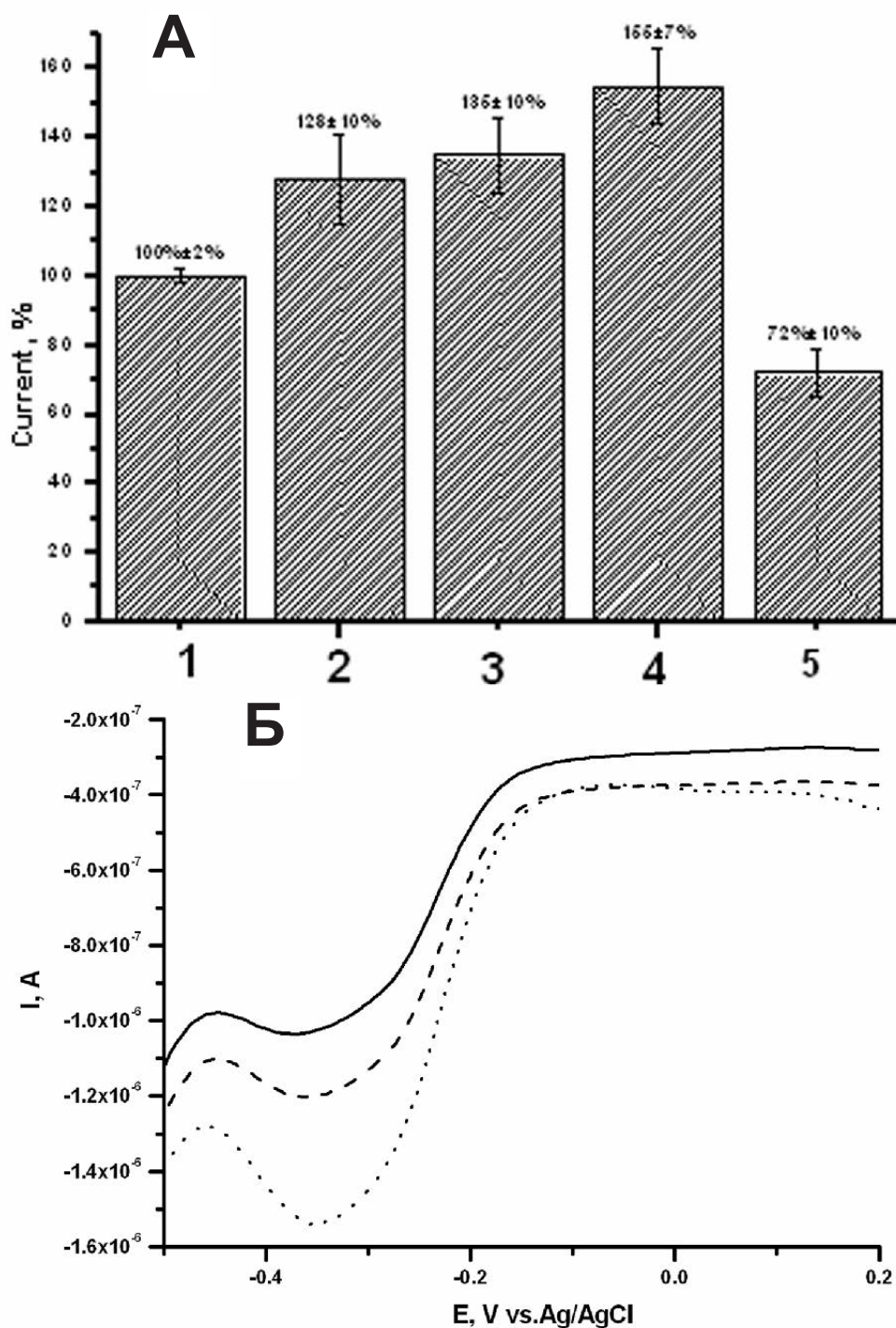


Рисунок 1.

А - Интенсивность пиков квадратно-волновых вольтамперограмм в аэробных условиях электродов: DDAB/Au/P450 3A4 (1); DDAB/Au/P450 3A4+ДК (100мкМ) (2), DDAB/Au/P450 3A4+витамин С (0,56 мМ) (3), DDAB/Au/P450 3A4+витамин С (0,56 мМ), затем ДК (100мкМ) (4), DDAB/Au/P450 3A4+витамин С (1,68 мМ) (5). Значения амплитуд токов КВВА были скорректированы по базовой линии.

Б - Квадратно-волновые вольтамперограммы электродов: DDAB/Au/P450 3A4 (—); DDAB/Au/P450 3A4+280 мкМ витамин С (---), DDAB/Au/P450 3A4+280 мкМ витамин С (...), затем 100 мкМ ДК.

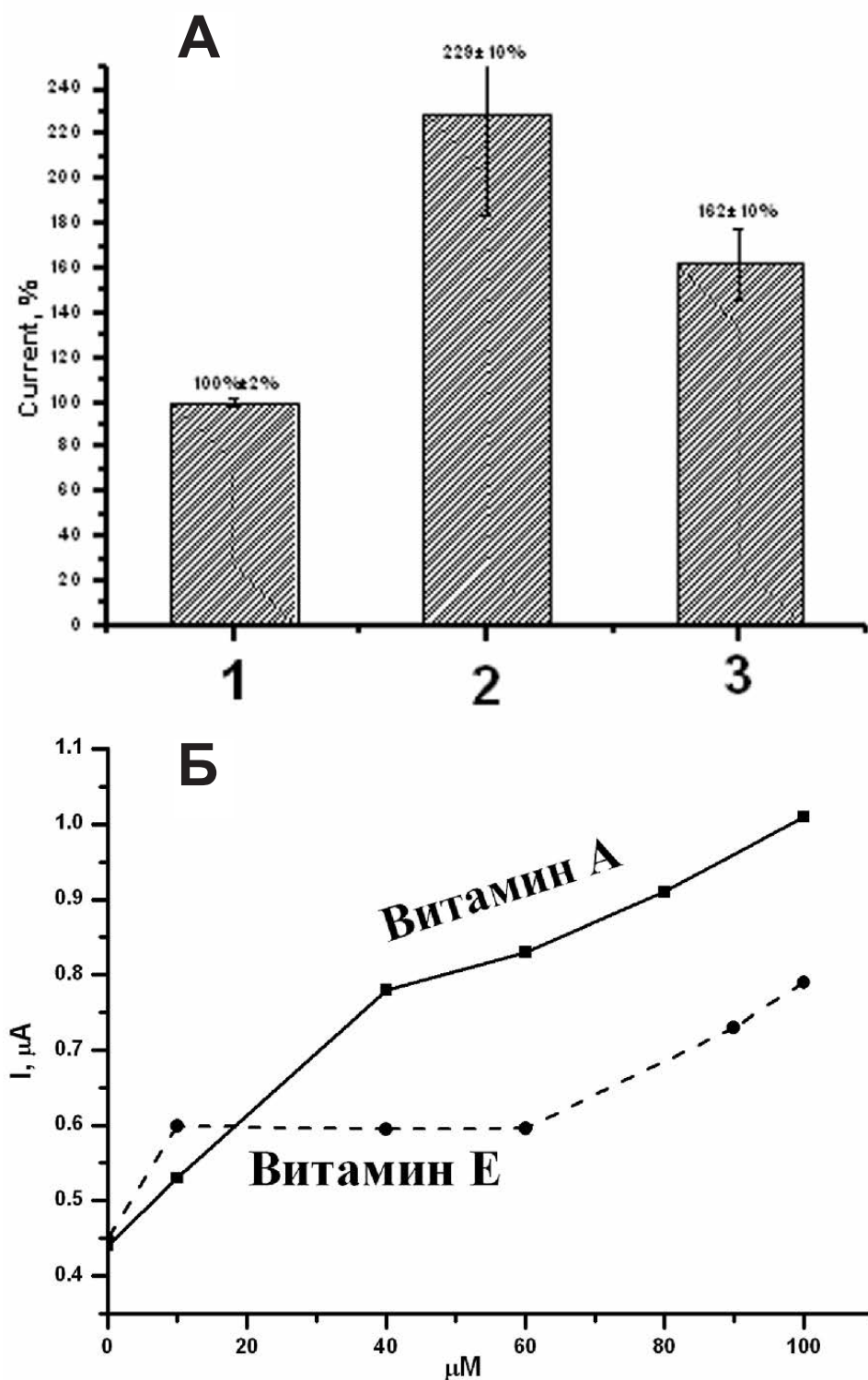


Рисунок 2.

А - Интенсивность пиков квадратно-волновых вольтамперограмм в аэробных условиях электродов: DDAB/Au/P450 3A4 (1); DDAB/Au/P450 3A4+витамин А (100 мкМ) (2), DDAB/Au/P450 3A4+витамин Е (100 мкМ) (3). Значения амплитуд токов КВВА были скорректированы по базовой линии.

Б - Зависимость интенсивности восстановительных токов цитохрома Р450 3А4 от концентрации витаминов А (-) и Е (--).

Ингибиторные свойства итраконазола (10 мкМ) по отношению к цитохрому P450 3A4 подтверждены в электрохимических экспериментах с ДДАБ/Au/P450 3A4 электродами. Итраконазол не даёт увеличение каталитического тока в системе ДДАБ/Au/P450 3A4. Последующее прибавление 0,1 мМ диклофенака (субстрата) также не даёт увеличение катодного пика цитохрома P450 3A4.

Вопрос о том, как различить проявление субстратных или антиоксидантных свойств с помощью анализа электрохимических параметров, был решён следующим образом. Витамин С и витамин А в присутствии азольного ингибитора итраконазола стимулируют рост каталитического тока. То есть, поведение витаминов С и Е в присутствии ингибитора каталитической активности итраконазола отличается от поведения типичного субстрата диклофенака. На основании этих экспериментальных данных можно сделать вывод о проявлении аскорбиновой кислотой и витамином А антиоксидантных свойств. Витамин Е в присутствии ингибитора итраконазола не даёт существенного увеличения каталитического тока, что доказывает проявление субстратных свойств витамином Е по отношению к цитохрому P450 3A4, как это описано в [31].

Были проведены исследования каталитической активности в присутствии витамина С как антиоксиданта, доказывающие антиоксидантные свойства витамина А, но проявление субстратных свойств витамином Е. В присутствии витамина С (0,28-1,12 мМ) возрастает катодный восстановительный ток цитохрома P450 3A4, но 100 мкМ ретинол ацетат (витамин А) не вызывал дополнительный рост восстановительного тока. В присутствии витамина С и токоферола ацетата (витамин Е) наблюдается рост дополнительного каталитического тока, что характерно для электрохимического поведения субстратов цитохромов P450 (рис. 3). На основе анализа электрохимических параметров разработан алгоритм, позволяющий различить механизмы действия антиоксидантов и типичных субстратов цитохрома P450 3A4.

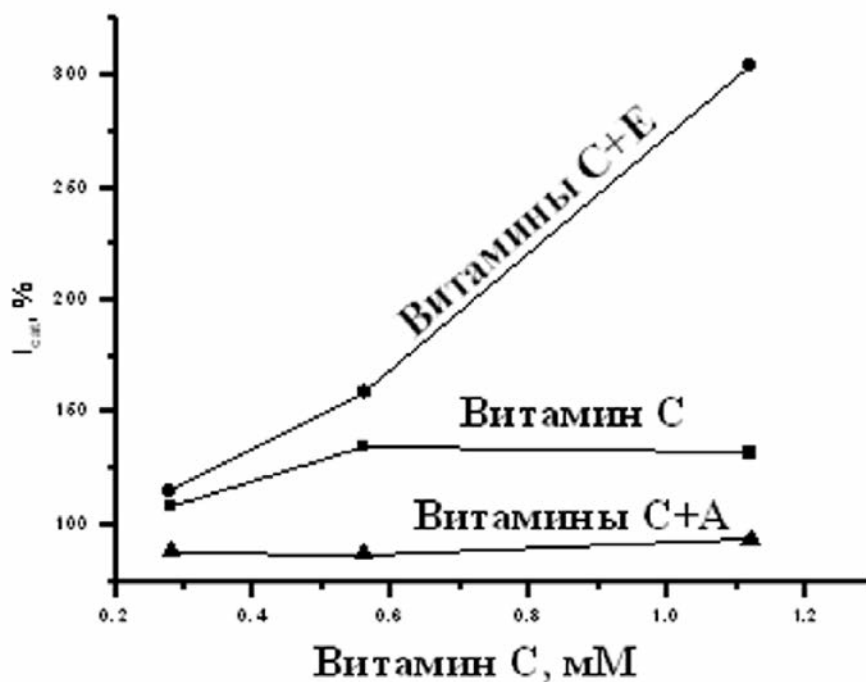


Рисунок 3.

Влияние витаминов А (100 мкМ) и Е (100 мкМ) на катодный восстановительный ток цитохрома P450 3A4 в присутствии витамина С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Проведенное электрохимическое исследование в опытах *in vitro* продемонстрировало возможный механизм взаимодействия витаминов-антиоксидантов с ферментами метаболизма лекарственных препаратов. Полученные данные так же доказывают проявление субстратных свойств витамина Е по отношению к цитохрому P450 3A4.

Изменение активности цитохрома P450 3A4 под действием антиоксидантных витаминов при их назначении в комбинации с лекарственными препаратами, метаболизирующимися этой формой цитохрома P450, может привести к изменению фармакодинамической эффективности, что требует от врача повышенного внимания, так как может привести к изменению профиля эффективности/безопасность применяемого лекарственного средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцев В.Г., Островский О.В., Закревский В.И. (2003) Экспериментальная клиническая фармакология, **66**, 66–70.
2. Владимиров Ю.А. (1998) Вестник РАМН, №7, 43–51.
3. Оковитый С.В. (2003) ФАРМиндекс-Практик, **5**, 85-111.
4. Halliwell B., Gutteridge J.M. (1990) Arch. Biochem. Biophys., **280**, 1–8.
5. Полосьяныч О.Б., Алексанян Л.А. (2005) РМЖ, **13**, 15-18.
6. Chisolm G.M., Steinberg D. (2000) Free Rad. Biol. Med., **28**, 1815–1826.
7. Собокарь М.А., Шух Е.В. (2010) Биомедицина, **3**, 7-18.
8. Кудрин А.Н., Коган А.Х., Королев В.В. (1978) Кардиология, **2**, 115-118.
9. Carr A.C., Frei B. (1999) Am. J. Clin. Nutr., **69**, 1086–1107.
10. Howell S.R., Shirley M.A. (1998) Drug Metab. Dispos., **26**, 234-239.
11. Paolini M., Antelli A., Pozzetti L., Spetlova D., Perocco P., Valgimigli L., Pedulli G.F., Cantelli-Forti G. (2001) Carcinogenesis, **22**, 1483-1495.
12. Kun Wang K., Chen S., Xie W., Wan Y.-J.Y. (2008) Biochem. Pharmacol., **75**, 2204–2213.
13. <http://cpd.ibmh.msk.su> (База данных по цитохрому P450).
14. Lewis D.F.V. (2001) Guide to Cytochrome P450. Structure and function. London and New York, pp. 51-75.
15. Akiyama I., Tomiyama K., Sakaguchi M., Takaishi M., Mori M., Hosok M., Nagamori S., Shimizu N., Huh N., Miyazaki M. (2004) Int. J. Mol. Med., **14**, 663-668.
16. Шумянцева В.В., Супрун Е.В., Булко Т.В., Добрынина О.В., Арчаков А.И. (2010) Биомед. химия, **56**, 55-71.
17. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Suprun E.V., Chalenko Y.M., Vagin M.Yu., Rudakov Y.O., Shatskaya M.A., Archakov A.I. (2011) Biochim Biophys. Acta. Proteins and Proteomics, **1814**, 94-101.
18. Makhova A.A., Shumyantseva V.V., Shich E.V., Bulko T.V., Kukes V.G., Sizova O.S., Ramenskaya G.V., Usanov S.A., Archakov A.I. (2011) BioNanoScience, **1**, 46-52.
19. Шумянцева В.В., Шух Е.В., Махова А.А., Булко Т.В., Кукес В.Г., Сизова О.С., Раменская Г.В., Усанов С.А., Арчаков А.И. (2011) Биомед. химия, **57**, 343-354.
20. Archakov A.I., Bachmanova G.I. (1990) Cytochrome P450 and Active Oxygen, Taylor and Francis, London.
21. Жуков А.А., Арчаков А.И. (1985) Биохимия, **50**, 1939-1952.

22. *Yasui H., Hayashi S., Sakurai H.* (2005) *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **20**, 1-13.
23. *Guengerich F.P.* (1978) *Biochemistry*, **17**, 3633-3639.
24. *Zangar R.C., Bollinger N., Weber T.J., Tan R.M., Markillie L., Karin N.J.* (2011) *Free Rad. Biol. Med.*, **51**, 2041-2047.
25. *Guryev O., Gilep A., Usanov S., Estabrook R.* (2001) *Biochemistry*, **40**, 5018-5031.
26. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Rudakov Yu.O., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Lisitsa A.V., Karuzina I.I., Archakov A. I.* (2007) *J. Inorg. Biochem.*, **101**, 859-865.
27. *Kanaeva I.P., Dedinskii I.R., Scotselyas E.D., Krainev A.G., Guleva I.V., Sevryukova I.F., Koen Ya.M., Kuznetsova G.P., Bachmanova G.I., Archakov A.I.* (1992) *Arch. Biochem. Biophys.*, **289**, 395-412.
28. *Rudakov Y.O., Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Suprun E.V., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Archakov A.I.* (2008) *J. Inorg. Biochem.*, **102**, 2020 -2025.
29. *Shirakami Y., Lee S., Clugston R., Blaner W.* (2012) *Biochim Biophys. Acta*, **1821**, 124-136.
30. *Bushue N., Wan Y.-J. Y.* (2010) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**, 1285–1298.
31. *Briegelius-Flohe R.* (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 737-740.

Поступила: 10. 02. 2012.

ROLE OF ANTIOXIDANTS IN ELECTRO CATALYSIS OF CYTOCHROME P450 3A4

*V.V. Shumyantseva¹, A.A. Makhova², T.V. Bulko¹, E.V. Shich², V.G. Kukes²,
S.A. Usanov³, A.I. Archakov¹*

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

²Moscow Medical Academy, Moscow, Russia

³Institute of Bioorganic Chemistry NAS, Minsk, Belarus

The electrochemical analysis of cytochrome P450 3A4 catalytic activity has shown that vitamins C, A and E influence on electron transfer and $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ reduction process of cytochrome P450 3A4. These data allow to assume possibility of cross effects and interference of vitamins-antioxidants with drugs metabolised by cytochrome P450 3A4, at carrying out of complex therapy. This class of vitamins shows antioxidant properties that lead to increase of the cathodic current corresponding to heme reduction of this functionally significant haemoprotein. Ascorbic acid of 0.028-0.56 mM concentration stimulates cathodic peak (an electrochemical signal) of cytochrome P450 3A4. At the presence of diclofenac (Voltaren) - a typical substrate of cytochrome P450 3A4 - the increase growth of a catalytic current testifying to an electrocatalysis and stimulating action of ascorbic acid is observed. In the presence of vitamins A and E also is registered dose-dependent (in a range of 10-100 M) increase in a catalytic current of cytochrome P450 3A4: the maximum increase corresponds to $229 \pm 20\%$ for 100 M of vitamin A, and $162 \pm 10\%$ for 100 M of vitamin E. Vitamin E in the presence of P450's inhibitor itraconazole doesn't give essential increase in a reductive current, unlike retinol (vitamin A). This effect can manifest substrate properties of tocopherol (vitamin E). The electrochemical approach for the analysis of catalytic activity of cytochrome P450 3A4 and studies of influence of biologically active compounds on an electrocatalysis is the sensitive and effective sensor approach, allowing to use low concentration of protein on an electrode (till 10^{-15} mol/electrode), to carry out the analysis without participation of protein redox partners, and to reveal drug-drug or drug-vitamins interaction in pre-clinical experiments.

Key words: cytochrome P450 3A4, diclofenac, antioxidants, electrochemistry, ferment electrodes, vitamins A, C, E, interaction.