

УДК 612.015.1; 543.559; 543.94

ЭЛЕКТРОАНАЛИТИЧЕСКИЕ ЦИТОХРОМ Р450 СИСТЕМЫ КАК МОДЕЛИ В ПОИСКЕ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ИССЛЕДОВАНИИ МЕТАБОЛИЗМА И АНАЛИЗЕ МЕЖЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

В.В. Шумянцева^{1,2}, Т.В. Булко¹, А.В. Кузиков^{1,2}, Р.А. Масамрех^{1,2}, П.И. Королева¹

¹ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия

² РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

Цитохромы Р450 – гем-содержащие монооксигеназы, катализирующие широкий спектр химических реакций в организмах всех живых существ [1, 2]. 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. Для исследования каталитической активности цитохромов Р450 разработаны различные системы и методы анализа: реконструированные системы на основе комплексов соответствующих изоформ цитохромов Р450 с флавопротеином НАДРН-зависимой цитохром Р450 редуктазой, бакулосомы, содержащие рекомбинантные цитохромы Р450 и их белки – редокс партнеры, микросомы человека или животных. Исследование каталитической активности изоферментов цитохрома Р450 в системах *in vitro* сопряжено с реконструированием электрон-транспортной цепи, включающей использование редокс-партнёрных белков, необходимых для восстановления иона железа гема цитохрома Р450 и осуществления каталитического процесса, стадиями выделения продуктов ферментативной реакции и их анализом. Электроанализ цитохромов Р450 позволяет использовать только гемопротеин, при этом электрод выполняет функции как донора электронов, так и заменяет сервисные белки-партнеры [3]. Для эффективного электрохимического процесса, связанного с транспортом электронов и реализации электрокатализа важную роль играет модификация электрода для иммобилизации гемопротеина.

В данной работе проведен сравнительный анализ электрохимических и электрокаталитических свойств цитохрома Р450 3А4, иммобилизованного на поверхности электродов (ПГЭ), модифицированных многостеночными углеродными нанотрубками (УНТ), диспергированными в хлороформе, и модифицированных синтетическим липидоподобным соединением дидодецилдиметиламмония бромидом (ДДАБ). Показано, что модификация УНТ применима для анализа цитохромов Р450 в биоматериале. Для исследования каталитических свойств цитохромов Р450 наиболее применима модификация с помощью ДДАБ [4] (Рис. 1).

В работе использовали трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения (ООО «КолорЭлектроникс», Москва, <http://www.colorel.ru/>). Диаметр рабочего электрода 0,2 см (площадь 0,0314 см²).

Цитохром Р450 3А4 (СУР3А4) участвует в метаболизме более 50 % существующих лекарственных препаратов. Цитохром Р450 3А4 имеет объемный активный центр, что приводит к связыванию субстратов, широко варьирующихся по размерам, или связыванию нескольких низкомолекулярных субстратов одновременно. Поэтому создание систем высокопроизводительного скрининга, с помощью которых можно было бы определять субстратные или ингибиторные свойства лекарств по отношению к цитохромам Р450 является актуальной задачей биохимии и фармакологии. Для исследования каталитической активности цитохромов Р450, высокопроизводительного скрининга потенциальных субстратов, ингибиторов, эффекторов, поиска средств-корректоров метаболической активности этого надсемейства гемопротеинов как биокатализаторов разработаны электрохимические методы анализа, основанные на использовании рекомбинантных и генетически модифицированных ферментов.

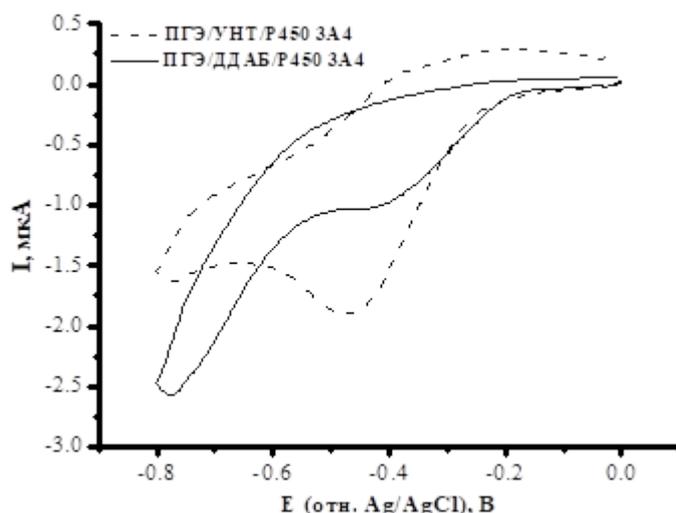


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы иммобилизованного P450 3A4 на ПГЭ/УНТ в хлороформе (---) или 1 мкл 0,1 М раствора ДДАБ (-). Параметры измерения: скорость развертки потенциала 50 мВ/с, диапазон потенциалов от 0 до -0,8 В (отн. Ag/AgCl). Измерения проводили в 1 мл электролитного буфера, рН 7,4, аэробные условия.

Разработаны новые подходы для высокочувствительной регистрации каталитической активности цитохромов P450 на основе флуоресцентных и электрохимических свойств субстратов и продуктов метаболических реакций цитохромов P450 [5]. Проведен анализ электрохимических параметров для модели совместного применения лекарств с различной терапевтической направленностью (антибиотики + метаболические антиоксидантные препараты, антибиотики + ингибиторы азольной природы, антибиотики + нейролептики, антибиотики + нестероидные противовоспалительные препараты). Проведена кластеризация межлекарственных взаимодействий экзогенных субстратов (диклофенак, эритромицин, омепразол, кларитромицин) и эндогенных субстратов (тестостерон, кортизол)

цитохрома P450 3A4 с целью корректировки «терапевтических окон» лекарственных препаратов. В группу препаратов, ингибирующих активность цитохрома P450 3A4, внесены витамины группы В, азольные ингибиторы (кетоконазол, итраконазол), абиратерон. Антиоксидантные метаболические препараты не оказывали влияния на каталитические константы метаболических превращений тестостерона, диклофенака, эритромицина.

Таблица 1. Классификация межлекарственных взаимодействий для корректировки «терапевтических окон»

Ингибирующая активность. Необходима корректировка «терапевтического окна» в сторону увеличения концентрации препарата	Отсутствие влияния. «Терапевтическое окно» не изменяется	Повышение активности P450. Возможна корректировка «терапевтического окна» в сторону уменьшения концентрации препарата
Витамины группы В (тиамин – витамин В1, рибофлавин – витамин В2, пиридоксин – витамин В6), Кетоконазол, Итраконазол, Абиратерон	Азафен, Липоевая кислота, Мельдоний, L-карнитин	Антиоксидантные метаболические препараты (Мексидол, Этоксидол, Цитохром с, Таурин)

Разработана система электроанализа на основе рекомбинантного цитохрома P450 3A4 для исследования межлекарственных взаимодействий препаратов, применяемых в комплексной терапии при лечении заболеваний ЖКТ, обусловленных инфицированием *Helicobacter pylori*. Показано межлекарственное взаимодействие ингибитора протонного насоса (ИПП, proton pump inhibitor, PPI) – омепразола – и макролидного бактериостатического антибиотика – эритромицина – на уровне цитохрома P450 3A4. Взаимное влияние этих лекарственных средств на цитохром P450 3A4 выражается в снижении скорости реакции N-деметилирования эритромицина (регистрируемой по образованию низкомолекулярного продукта формальдегида) в присутствии омепразола, но в отсутствии влияния эритромицина на метаболические превращения омепразола, регистрируемые методом масс-спектрометрии по образованию продукта – омепразол сульфона. Такие межлекарственные взаимодействия могут быть связаны с более высоким сродством омепразола к цитохрому P450 3A4 (спектральная константа диссоциации $K_d = 18 \text{ мкМ}$) по сравнению с эритромицином ($K_d = 52 \text{ мкМ}$). В отличие от экспериментов на добровольцах, разработанная модельная система позволяет анализировать межлекарственные взаимодействия на уровне цитохрома P450 3A4.

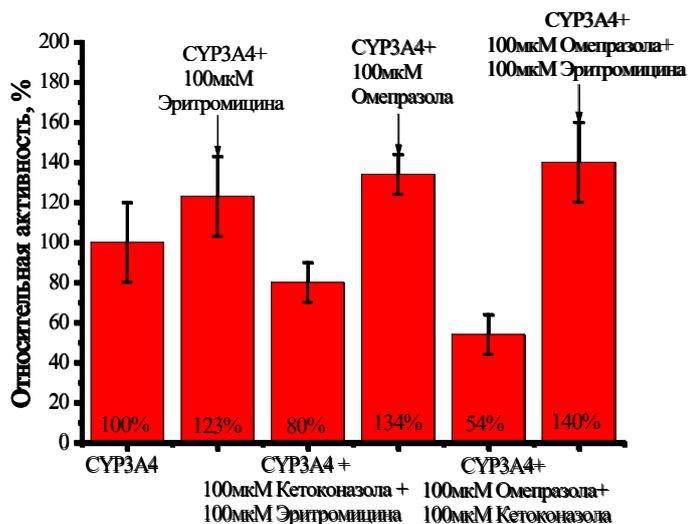


Рис. 2. Относительная интенсивность восстановительных пиков циклических вольтамперограмм цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на печатном графитовом электроде, модифицированном ДДАБ, в аэробных условиях.

В присутствии 100 мкМ кетоконазола – ингибитора смешанного типа для цитохрома P450 3A4 – регистрируется снижение как амплитуды восстановительного тока эритромицина (рис. 2), так и уменьшение каталитической константы k_{cat} , рассчитанных по накоплению формальдегида как продукта цитохром P450 3A4-зависимой реакции N-деметилирования эритромицина. Кетоконазол снижает каталитический ток, регистрируемый в присутствии эритромицина (рис. 2), а каталитическая константа k_{cat} реакции N-деметилирования уменьшается с $13,8 \text{ мин}^{-1}$ до $2,22 \text{ мин}^{-1}$. В присутствии кетоконазола также регистрировали снижение амплитуды восстановительного тока омепразола, что характерно для разработанного алгоритма электрохимического анализа межлекарственных взаимодействий типа субстрат + ингибитор.

Полипрагмазия при проведении комплексной терапии связана с большим риском проявления межлекарственных взаимодействий и, как следствие, их нежелательных последствий. Разработка экспериментальных моделей для оценки МЛВ при приеме разных групп медицинских препаратов является важной задачей. В настоящем исследовании предложен подход и разработана неинвазивная модель на основе цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на электроде как источнике электронов, для исследования межлекарственных взаимодействий.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Ortiz de Montellano P.R. (2015) Cytochrome P450 Structure, Mechanism, and Biochemistry, Springer, New York, 912 p. DOI: 10.1007/978-3-319-12108-6
- Guengerich F.P. (2015) in: P.R. Ortiz de Montellano (Ed.), Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, Springer, New York, pp. 523–785.
- Кузиков А.В., Масамрех Р.А., Арчаков А.И., Шумянцева В.В. (2018). Биомедицинская химия, **64**, 149–168. DOI: 10.18097/PBMC20186402149.
- Кузиков, А.В., Булко, Т.В., Королева, П.И., Масамрех, Р.А., Бабкина, С.С., Гилеп, А.А., Шумянцева, В.В. (2020). Биомедицинская химия, **66**(1), 64–70. DOI: 10.18097/PBMC2020660164
- V. Shumyantseva^{1,2,3}, Tatiana V. Bulko^{1,3}, Alexey V. Kuzikov^{1,2,3}, Rami A. Masamrek^{1,2,3}, Apollinariya Yu. Konyakhina³, Iuliia Romanenko⁵, Johannes B. Max⁵, Moritz Köhler⁵, Andrei A. Gilep⁴, Sergey A. Usanov⁴, Dmitry V. Pergushov³, Felix H. Schacher^{5,6,7}, Larisa V. Sigolaeva^{1,3} All-electrochemical nanocomposite two-electrode setup for quantification of drugs and study of their electrocatalytic conversion by cytochromes P450. *Electrochimica Acta* 336 (2020) 135579. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.135579>