

ТАУРИН КАК МОДУЛЯТОР КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМА P450 3A4

© 2015 В.В. Шумянцева^{1*}, А.А. Махова², Т.В. Булко¹,
Р. Бернхардт³, А.В. Кузиков¹, Е.В. Ших², В.Г. Кукес²,
А.И. Арчаков¹

¹ Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121 Москва, ул. Погодинская, 10; факс: +7(495)245-0857,
электронная почта: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

² Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991 Москва,
ул. Трубецкая, 8, стр. 2

³ Институт биохимии Саарлендского университета,
Германия, 66123 Саарбрюккен

Поступила в редакцию 03.10.14
После доработки 25.11.14

Исследовано влияние биологически активного соединения таурина на стабильность и каталитические свойства гемопротейна цитохрома P450 3A4. Анализ каталитической активности проводили электрохимическими методами (с помощью циклической и квадратно-волновой вольтамперометрии) с использованием иммобилизованного на электроде цитохрома P450 3A4. Показано, что таурин в диапазоне концентраций 10–70 мкМ стимулирует электрохимическое восстановление цитохрома P450 3A4, причем при концентрации 50 мкМ электровосстановление максимально ($115 \pm 3\%$). Таурин оказывает выраженный эффект ослабления ингибирования итраконазолом изофермента цитохрома P450 3A4. Показано, что таурин выполняет защитные функции по отношению к гемопротейну, стабилизируя фермент при проведении электролиза при контролируемом напряжении в присутствии субстрата – эритромицина, что выражается в возрастании «остаточной» восстановленной формы гемопротейна (52 ± 5 и $71 \pm 8\%$ соответственно).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром P450, антиоксиданты, метаболизм лекарств, биоэлектрохимия, таурин.

Цитохромы P450 – наиболее важные катализаторы окисления/гидроксилирования как эндогенных, так и экзогенных соединений, участвующие в первой фазе метаболизма лекарственных препаратов. Цитохромы P450 имеют большую клиническую значимость, а также биотехнологическое применение как потенциальные биореакторы [1–6]. В связи с этим активно развиваются методы анализа активности ферментов, метаболизирующих лекарственные препараты, ведется поиск белков редокс-партнеров, альтернативных доноров электронов, и разрабатываются системы, моделирующие (симулирующие) каталитическую активность цитохромов P450 в области аналитических и синтетических методов [7–13].

Принятые сокращения: DDAB – дидодецилдиметиламмоний бромид, KBBA – квадратно-волновая вольтамперометрия, DF – диклофенак, ITR – итраконазол, АФК – активные формы кислорода.

* Адресат для корреспонденции.

Важнейшей задачей современной биохимии и медицинской энзимологии является повышение эффективности и безопасности лекарственной терапии на основе изучения активности ключевых ферментов метаболизма лекарственных препаратов. Эта задача может быть решена не только путем поиска новых лекарственных веществ, но и благодаря более рациональному использованию уже существующих лекарственных средств, а также поиску индукторов и ингибиторов биотрансформации лекарственных веществ. Регуляция каталитической активности ферментов может протекать по различным механизмам: встраивание в мембраны, взаимодействие с белками-партнерами, химическая модификация, влияние детергентов, аллостерические механизмы [14, 15]. Для целенаправленной регуляции биотрансформации лекарственных веществ путем изменения активности системы цитохрома P450 наиболее пригодны природные регуляторы – витамины и витаминоподобные вещества, которые являются естественными

компонентами внутренней среды, отличаются безвредностью и физиологичностью действия [16–20].

Цитохром P450 3A4 является наиболее функционально значимым среди цитохромов P450, т.к. метаболизирует 225 субстратов, из которых 191 вещество является лекарством, а из 97 ингибиторов этой формы 87 соединений являются лекарствами. Цитохром P450 3A4 участвует в метаболизме более 50% применяемых лекарственных препаратов [1, 5].

В клинической фармакологии хорошо известен факт токсичности большинства применяемых лекарственных препаратов. В связи с этим активно ведется поиск биологически активных веществ, сочетанный прием которых вместе с лекарственными препаратами снижает токсический эффект [16–20]. Ранее авторами было показано, что витамины группы В ингибируют электрокаталитическую активность цитохрома P450 3A4. В клинических экспериментах наблюдали влияние витаминов группы В на метаболизм нестероидного противовоспалительного препарата диклофенак (вольтарен). Витамины группы В позволяют сократить длительность терапии нестероидным противовоспалительным препаратом диклофенаком и снизить ежедневную потребность в диклофенаке за счет подавления взаимодействия диклофенака с цитохромом P450 3A4 [16, 17].

Важнейшим метаболитом, определяющим состояние клеточного иммунитета, уровень антиоксидантной защиты, детоксикационных возможностей организма, является серосодержащая аминокислота – таурин. Таурин (2-аминоэтансульфоновая кислота) является наиболее распространенной из свободных аминокислот в организме человека и играет важную роль в таких биологических процессах, как конъюгация желчных кислот, поддержание гомеостаза кальция, осморегуляция и стабилизация мембран. У людей таурин образуется в гепатоцитах в результате обмена веществ из метионина и цистеина через гипотаурин. Таурин в высокой концентрации содержится в сердечной мышце, центральной нервной системе, лейкоцитах, скелетной мускулатуре. Другие клетки (например, нейтрофилы) содержат очень высокие концентрации таурина благодаря захвату вещества непосредственно из крови, куда таурин поступает как из эндогенных источников, так и из пищи. Биосинтетические способности человека производить таурин ограничены у новорожденных, а также снижаются с возрастом и при некоторых патологических процессах (травмы, сепсис). В таких ситуациях поступление таурина является важным источником этой аминокислоты. Видо-

вую резистентность к туберкулезу связывают с накоплением таурина в кроветворной, лимфоидной ткани и печени [21]. Таурин относится к органическим осмолитам. Эти вещества накапливаются в клетке без изменения ее гомеостаза, структуры и функции в отличие от электролитов и мочевины, которые могут повреждать клетку, когда накапливаются в ней в больших количествах или возникают выраженные колебания их концентрации.

Таурин широко применяется в медицине: в неврологии для лечения эпилепсии и мышечных дистрофий, в комплексной терапии осложнений сахарного диабета, лечении атеросклероза. В офтальмологии таурин выполняет регенеративную функцию, поддерживает осмотическое равновесие в хрусталике, обеспечивая его прозрачность (недостаток таурина приводит к развитию катаракты), обладает рядом защитных свойств (антиоксидантная защита сетчатки, снятие спазма accommodation) при воздействии на организм человека неблагоприятных факторов [22]. Таурин способен осуществлять детоксикацию вредных соединений, что объясняет его защитные эффекты при отравлении некоторыми лекарственными препаратами и ядами. Под действием таурина улучшается печеночный кровоток и уменьшаются проявления цитолитического синдрома. Таурин снижает образование гипохлорной кислоты и гидроксильных радикалов, практически не воздействуя на генерацию супероксид-радикалов, защищает цитохром P450 2E1 от окислительного расщепления в присутствии ацетаминифена [23], а также проявляет свойства нейромодулятора и антиоксиданта, модулирует индукцию мРНК, кодирующую цитохром P450 3A4, в присутствии рифампицина [24].

Таким образом, серосодержащая аминокислота таурин широко применяется в клинической практике как антиоксидант, мембраностабилизирующее средство, гепатопротектор.

Таурин используется также в составе стандартной комплексной терапии, что подразумевает сочетание нескольких лекарственных препаратов, часто метаболизирующихся одним и тем же изоферментом цитохрома P450, что приводит к повышению вероятности возникновения взаимодействия лекарственных препаратов на уровне метаболизма.

Взаимодействия могут быть клинически значимыми и приводить к изменению эффективности лекарственных препаратов и/или безопасности их применения. В таком случае природное соединение таурин может быть использовано в качестве модулятора активности системы изофермента цитохрома P450, что имеет большое значение в биохимических исследова-

ниях механизмов катализа, а также в практической медицине для повышения эффективности и безопасности комплексной фармакотерапии заболеваний.

Электрохимические подходы перспективны для исследования фермент-субстратных взаимодействий вследствие высокой чувствительности [9–11]. Анализ каталитической активности цитохрома P450 электрохимическими методами не требует белков редокс-партнеров и дорогостоящих доноров электронов (NAD(H)P). В данной работе электрохимическими методами было исследовано влияние таурина на каталитические функции цитохрома P450 3A4 как наиболее активного участника метаболизма лекарственных препаратов.

Электроаналитические характеристики регистрировали с помощью цикловольтамперометрии и вольтамперометрического анализа (квадратно-волновой вольтамперометрии) по вольтамперным параметрам электродов с иммобилизованным цитохромом P450 3A4 [8–11]. Показано защитное действие таурина (50 мкМ) на цитохром P450 3A4 при электрохимическом восстановлении, а также выраженный эффект ослабления ингибирования итраконазолом этого фермента.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электрохимические исследования проводили с помощью потенциостата AUTOLAB 12 («Metrohm Autolab», Нидерланды), снабженного программным обеспечением GPES (версия 4.9). 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 «АвтоКОМ», Россия, <http://www.membrans.ru>), с графитовыми рабочим и вспомогательными электродами (графит фирмы «Acheson», Россия) и хлорсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода 2 мм. Все потенциалы приведены относительно хлорсеребряного Ag/AgCl электрода сравнения.

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

Реагенты. В работе использовали следующие реактивы: дидодецилдиметиламмоний бромид

(DDAB), $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, боргидрид натрия, итраконазол («Sigma-Aldrich», США); диклофенак («Новартис», Россия); этоксидол (50 мг/мл, ОАО «Синтез», Россия); эритромицин, таурин («Пик-Фарма», Россия); уксусная кислота, ацетат аммония и ацетилацетон (ООО «Спектр-Хим», Россия).

В электрохимических экспериментах использовали свежеприготовленные растворы 10 мМ диклофенака в воде, 10 мМ таурина в воде, 10 мМ эритромицина (этанол : вода 7 : 3), 10 мМ раствор итраконазола в диметилсульфоксиде. Концентрацию рекомбинантного цитохрома P450 3A4 (Институт биоорганической химии, Минск, Беларусь) определяли по образованию комплекса восстановленной формы с оксидом углерода, используя коэффициент поглощения $\epsilon_{450} = 91 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Синтез коллоидного раствора золота (наночастиц золота), стабилизированного DDAB. К 1 мл 0,1 М DDAB в хлороформе прибавляли при интенсивном перемешивании 0,5 мл 10 мМ водного раствора $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. При интенсивном перемешивании медленно прибавляли свежеприготовленный водный раствор NaBH_4 (0,4 М, 0,2 мл). Через 2 ч окрашенный органический слой отделяли и промывали равным объемом воды [11].

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 (18,2 мкМ). Электроды оставляли на 12 ч при 4° во влажной камере, предотвращающей полное высыхание электродов.

Определение N-деметиلاзной активности цитохрома P450 3A4. В процессе цитохром P450 3A4-зависимого электрокаталитического N-деметилирования эритромицина одним из продуктов реакции являлся формальдегид, по накоплению которого судили об активности иммобилизованного на электроде фермента. Электрод с иммобилизованным цитохромом P450 3A4 помещали в электрохимическую ячейку объемом 1 мл, содержащую калий-фосфатный буфер (pH 7,4) и 100 мкМ эритромицин. Электролиз проводили при фиксированном потенциале рабочего электрода $E = -500 \text{ мВ}$ в течение 20 мин. После электролиза реакцию смесь смешивали с реактивом Nash (4 М ацетат аммония, 0,1 М ледяная уксусная кислота, 0,04 М ацетилацетон) в соотношении 1 : 1 и инкубировали при температуре 37° в течение 30 мин для развития окраски. Концентрацию формальдегида, образовавшегося в процессе цитохром P450-зависимого электрокаталитического N-демети-

рования эритромицина, определяли спектрофотометрически с использованием спектрофотометра Cary 100 Scan UV-Vis («Agilent», Нидерланды), коэффициент поглощения $\varepsilon_{412} = 4 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [11, 12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении электрохимических экспериментов были использованы трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати. Такие печатные электроды имеют ряд преимуществ: миниатюризация, возможность работать в горизонтальном или вертикальном режимах, низкий базовый ток, широкий диапазон рабочих потенциалов, простота проведения модификации электродов для наноструктурирования и/или иммобилизации биологических объектов. При модификации поверхности печатных графитовых электродов 0,1 М DDAB/Au в хлороформе с последующим включением в мембраноподобную матрицу цитохрома P450 3A4 наблюдается прямой безмедиаторный перенос электронов между электродом и гемом. Т.к. регистрируется сигнал электровосстановления гемопротейна, параметры электрохимической системы электрод/цитохром P450 чувствительны к микроокружению, субстратам, ингибиторам и модуляторам (с различными механизмами) активности белка.

Для исследования электроаналитических характеристик использовали вольтамперные отклики электродов, регистрируемые с помощью

цикловольтамперметрии и вольтамперического анализа квадратно-волновой вольтамперометрии (КВВА). Количество электроактивного белка на поверхности электрода может быть рассчитано из циклической вольтамперограммы по уравнению:

$$\Gamma_0 = Q/nFA,$$

где Γ_0 – количество электроактивного вещества на единицу площади электрода, моль/см²; Q – количество электричества, Кулон (рассчитывается интегрированием пика восстановления); n – число электронов; F – постоянная Фарадея (96485), Кулон/моль; A – площадь рабочего электрода, см² (0,0314 см²) [25]. По данным цикловольтамперметрии электроактивны 18–20% молекул цитохрома P450 3A4, что составляет 4–5 пмоль/электрод.

В результате каталитической цитохром P450-зависимой реакции в электрохимической системе регистрируется катодный ток, соответствующий дополнительному потоку электронов к органическому субстрату (лекарственному препарату) в системе. Катодный ток (имеющий отрицательное значение в отличие от анодных процессов с положительным значением тока) является мерой электрокаталитической активности фермента.

На рис. 1 и 2 представлены циклические и квадратно-волновые вольтамперограммы электрода DDAB/Au/P450 3A4 до и после прибавления диклофенака (100 мкМ). Каталитический ток (катодный отрицательный) ток, регистриру-

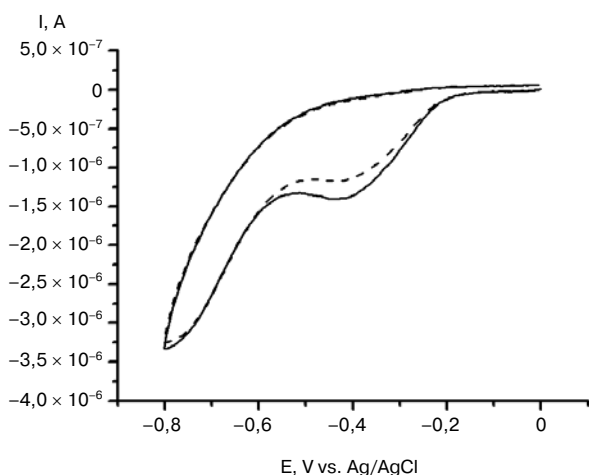


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы электрода DDAB/Au/P450 3A4 до (пунктирная кривая) и после (сплошная кривая) добавления 100 мкМ диклофенака

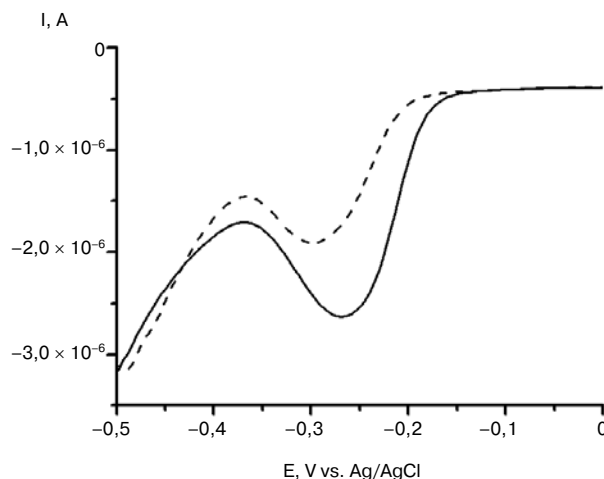


Рис. 2. Квадратно-волновые вольтамперограммы электрода DDAB/Au/P450 3A4 до (пунктирная кривая) и после (сплошная кривая) добавления 100 мкМ диклофенака

емый в присутствии этого лекарственного препарата, свидетельствует о протекании электрокаталитической реакции: диклофенак (DF) проявляет субстратные свойства по отношению к цитохрому P450 3A4 [26].

Регистрируя каталитический ток в присутствии субстрата, можно рассчитать такие важные кинетические параметры ферментативного процесса, как константы Михаэлиса (K_m) и электрохимическую каталитическую константу (k_{cat}) по электрохимической форме уравнения Михаэлиса–Ментен [27]:

$$I_{cat} = (I_{cat\ max} [S]) / (K_m + [S]),$$

где I_{cat} – каталитический ток при определенной концентрации субстрата, Ампер; $I_{cat\ max}$ – максимальный каталитический ток при полном насыщении фермента, А; $[S]$ – концентрация субстрата, М; K_m – кажущаяся константа Михаэлиса, М.

Максимальное значение каталитического тока может быть определено экспериментально по данным амперометрии при контролируемом напряжении при насыщающей концентрации субстрата в системе. Уравнение максимального каталитического тока может быть представлено как:

$$I_{cat\ max} = nFA\Gamma_0 k_{cat} [28],$$

где n – число электронов; F – постоянная Фарадея; A – площадь рабочего электрода, см²; Γ_0 – поверхностная концентрация электроактивного

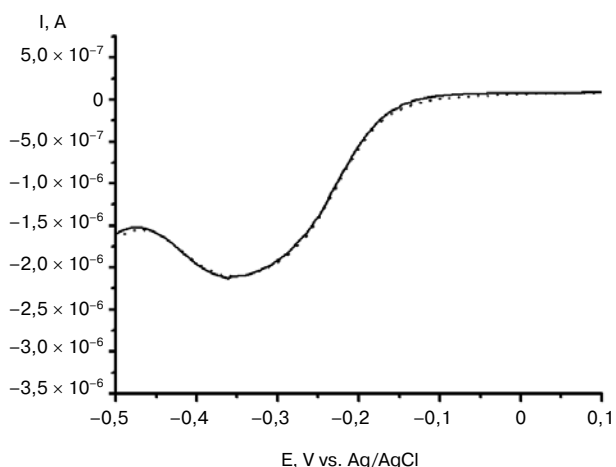


Рис. 3. Квадратно-волновые вольтамперограммы электродов: DDAB/Au/P450 3A4 + 10 мкМ ITR (сплошная кривая); DDAB/Au/P450 3A4 + 10 мкМ ITR, затем 100 мкМ DF (штрихпунктирная кривая)

фермента, моль/см²; k_{cat} – электрохимическая каталитическая константа, с⁻¹.

Электрохимическая константа Михаэлиса K_m диклофенака составила 40 ± 10 мкМ.

Квадратно-волновые вольтамперограммы электрода DDAB/Au/P450 3A4 в присутствии субстрата диклофенака и в присутствии ингибитора итраконазола и диклофенака приведены на рис. 3.

Ингибиторы цитохрома P450 не дают увеличения катодного тока при связывании, т.к. не происходит дополнительных процессов переноса электронов в системе. Итраконазол является эффективным противогрибковым препаратом, применяемым при лечении онихомикозов [29]. Итраконазол относится к азольным ингибиторам цитохромов P450, образуя координационную связь с ионом железа гема [30, 31]. При прибавлении к электроду DDAB/Au/P450 3A4 итраконазола не наблюдается увеличение катодного каталитического тока, последующее прибавление диклофенака также не приводит к регистрации электрокатализа (рис. 3; рис. 4, 3 и 4). Это связано с проявлением ингибирующих свойств итраконазола по отношению к цитохрому P450 3A4 [30].

В связи с высокой биологической активностью таурина и широким использованием этого вещества в клинической практике в данной работе было исследовано его влияние на один из основных ферментов метаболизма лекарственных препаратов – цитохром P450 3A4.

Электрохимическую активность цитохрома P450 3A4 также исследовали с помощью анализа отклика фермента на вещество-модулятор. При прибавлении таурина (конечная концентрация 50 мкМ) к электроду DDAB/Au/P450 3A4 наблюдается увеличение катодного тока, что обычно характерно для субстратов цитохрома P450, несмотря на то, что таурин не является субстратом цитохрома P450 3A4 [11] (рис. 4, 5). Для доказательства отсутствия связывания таурина с цитохромом P450 по типу субстратов/ингибиторов были исследованы разностные спектры поглощения цитохрома P450 в присутствии диклофенака, итраконазола и таурина. Разностный спектр связывания с диклофенаком имеет характерную форму для связывания субстратов I типа: с максимумом при 380 нм и минимумом при 416 нм [32]. Итраконазол дает разностный спектр связывания II типа, характерный для соединений-ингибиторов [32], с максимумом при 420 нм и минимумом при 390 нм. Таурин не дает характерных разностных спектров связывания ни I, ни II типа, ни модифицированного II типа, что доказывает отсутствие субстратных свойств у таурина по отношению к цитохрому P450 3A4.

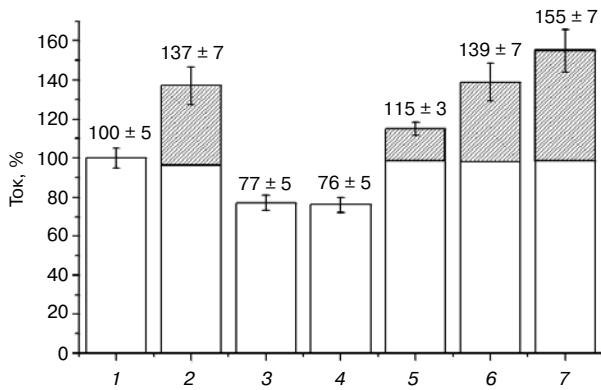


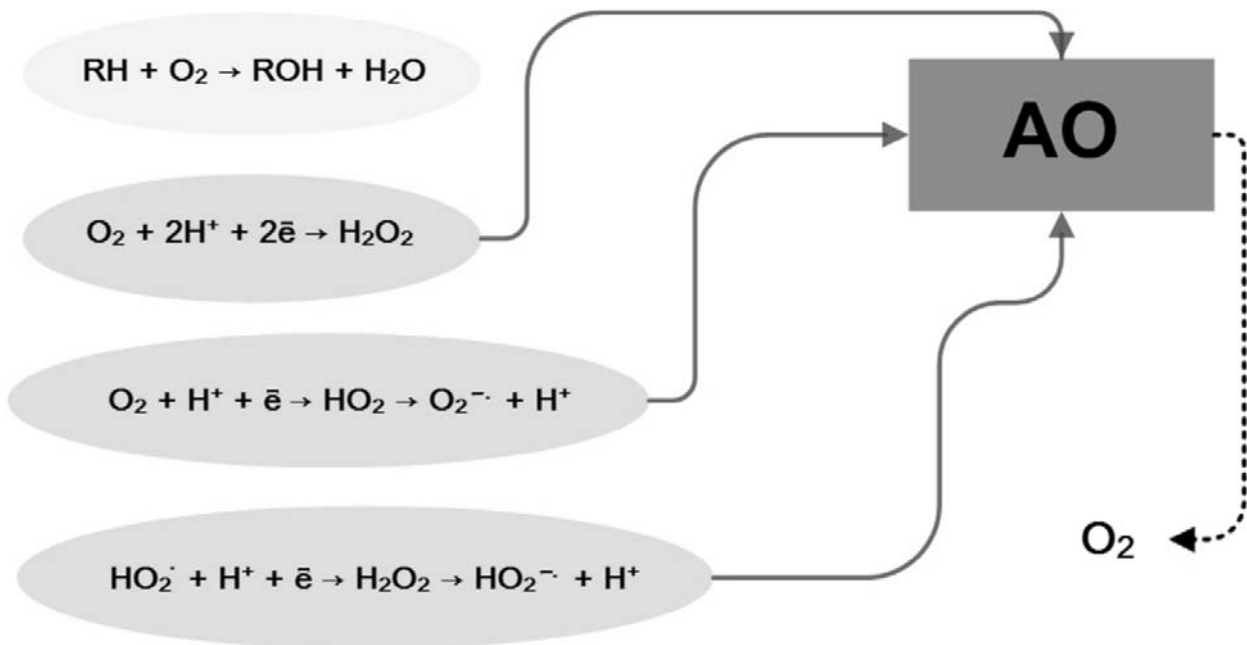
Рис. 4. Интенсивность пиков квадратно-волновых вольтамперограмм в аэробных условиях электродов: DDAB/Au/P450 3A4 (1); DDAB/Au/P450 3A4 + DF, 100 мкМ (2); DDAB/Au/P450 3A4 + ITR, 10 мкМ (3); DDAB/Au/P450 3A4 + ITR, 10 мкМ, затем DF, 100 мкМ (4); DDAB/Au/P450 3A4 + TAU, 50 мкМ (5); DDAB/Au/P450 3A4 + TAU, затем ITR (6); DDAB/Au/P450 3A4 + ET, 180 мкМ (7). Значения амплитуд токов КВВА были скорректированы по базовой линии. Приведены средние значения пяти экспериментов. TAU – таурин, ET – этоксидол

Увеличение каталитического тока в присутствии таурина можно объяснить антиоксидантными свойствами этого соединения. В результате электрокаталитического восстановления цитохрома P450 3A4 происходит генерирование активных форм кислорода (АФК), что в соответ-

ствии с механизмом каталитического действия цитохрома P450 может приводить к частичной инактивации фермента [33–36]. Антиоксиданты нейтрализуют АФК и увеличивают локальную концентрацию кислорода как косубстрата изоферментов цитохрома P450 (схема).

Антиоксидантные свойства таурина проявляются во взаимодействии с пероксидом водорода, супероксиданион-радикалами, гидроксид-радикалами, что приводит к стабилизации фермента и увеличению восстановительного катодного тока. Ингибирующее действие итраконазола (в концентрации 10 мкМ) в присутствии 50 мкМ таурина существенно снижается (рис. 4, б). Основной вывод, который можно сделать на основании проведенных экспериментов – таурин снижает ингибирующий эффект итраконазола. В экспериментах по схеме «итраконазол, затем таурин» итраконазол, как и следует ожидать, ингибирует каталитический цикл цитохрома P450 3A4, что проявляется в отсутствии каталитического тока ($102\% \pm 3$).

Цитохромы P450 относятся к самоинактивирующимся в процессе катализа ферментам. Процесс деструкции связан с окислительной деградацией и/или окислительной модификацией за счет АФК, генерирующихся в процессе активации кислорода, гидроксирования субстратов и пероксидазных реакций. Такая инактивация приводит к нарушению функции оксигеназной системы и, как следствие, к изменению скорос-



Механизм образования АФК в каталитическом цикле цитохрома P450 (RH – субстрат, АО – антиоксидант)

ти и путей метаболизма лекарственных препаратов и других ксенобиотиков, а также нарушению обмена холестерина, стероидных гормонов и других экзогенных субстратов, что может являться одной из причин патогенеза различных заболеваний. Антиоксиданты, снижая уровень АФК, могут проявлять защитные свойства по отношению к цитохромам P450. С другой стороны, антиоксиданты влияют на разобщение монооксигеназного цикла, разрушая пероксид водорода и блокируя пероксидазный путь модификации субстратов [33, 34], что может выражаться в наработке меньших количеств продуктов монооксигеназных реакций.

Используя электрохимическое восстановление цитохрома P450 3A4 в качестве инструмента для исследования электрокаталитической активности гемопротейна и влияния на электрохимическую цитохром P450-содержащую систему различных биологически активных веществ, можно сделать вывод: таурин, являясь антиоксидантом, положительно влияет на электрокаталитическое восстановление цитохрома P450 3A4. При этом таурин снижает ингибирующий эффект итраконазола. Таурин не влияет на активность диклофенака в цитохром P450 электрохимической системе.

Полученные данные согласуются с результатами клинических испытаний, полученных при наблюдении пациентов, получавших итраконазол и итраконазол в сочетании с таурином. Активность цитохрома P450 3A4 оценивалась неинвазивным методом по соотношению концентраций 6β-гидроксикортизола (образуется из кортизола исключительно под действием цитохрома P450 3A4) и кортизола (6β-гидроксикортизол/кортизол), концентрации которых в моче определяли методом хромато-масс-спектрометрического анализа по стандартной методике высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [37]. По результатам теста определения соотношения 6β-гидроксикортизола/кортизола в моче было показано, что одновременное с итраконазолом назначение таурина больным онхомикозом на фоне длительного лечения приводит к статистически значимому меньшему ингибированию фермента цитохрома P450 3A4 [37]. Назначение таурина, оказывающего протекторное действие на изофермент цитохрома P450 3A4, позволяет повысить безопасность длительного применения итраконазола у больных онхомикозом.

С целью выявления защитной роли таурина на ферменты системы цитохрома P450 были проведены эксперименты по оценке N-деметилазной электрокаталитической активности цитохрома P450 3A4 в отношении макролидного

антибиотика эритромицина в присутствии таурина. Показано, что в присутствии 50 мкМ таурина в электрохимической системе наблюдается увеличение электрокаталитической константы на 16% по сравнению с системой, в которой таурин отсутствовал (таблица).

Таурин, как антиоксидант, снижает накопление АФК в процессе электрокатализа, предотвращая тем самым инактивацию фермента, о чем свидетельствует увеличение скорости N-деметилазной реакции эритромицина, катализируемой цитохромом P450 3A4.

Защитная роль таурина на цитохром P450 3A4 была также показана по способности цитохрома P450 3A4 сохранять N-деметилазную электрокаталитическую активность после электролиза при контролируемом напряжении ($E = -500$ мВ). В процессе электролиза неизбежно происходит накопление АФК, инактивирующих фермент. Было показано, что после электролиза в присутствии в системе 50 мкМ таурина и эритромицина восстановительный каталитический ток цитохрома P450 3A4 составлял $71 \pm 8\%$, в то время как в отсутствие таурина – лишь $52 \pm 5\%$ (за 100% был принят каталитический ток цитохрома P450 3A4 в присутствии эритромицина до электролиза при контролируемом напряжении).

Экспериментальные данные, полученные с помощью анализа электрохимических параметров электродов с иммобилизованным цитохромом P450 3A4, свидетельствуют о защитной роли за счет антиоксидантной активности таурина в цитохром P450-зависимых системах. Таурин нейтрализует АФК, предотвращая инактивацию фермента, и выполняет защитные функции по

Кинетические параметры CYP3A4-зависимой электрокаталитической N-деметилазной активности в отношении эритромицина

Фермент + субстрат	Антиоксидант	Продукт электрокаталитической реакции (формальдегид, мкМ)	k_{cat} , мин ⁻¹
CYP3A4 + эритромицин	—	$1,15 \pm 0,11$	$3,1 \pm 0,3$ (100%)
CYP3A4 + эритромицин	таурин (50 мкМ)	$1,32 \pm 0,11$	$3,6 \pm 0,4$ (116%)
CYP3A4 + эритромицин	этоксидол (180 мкМ)	$0,98 \pm 0,10$	$2,7 \pm 0,4$ (87%)

Примечание. Приведены средние результаты трех опытов.

отношению к гемопротейну, а также снижает ингибирующее влияние итраконазола.

Были проведены эксперименты по оценке влияния антиоксидантного препарата этоксида (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния гидроксидбутилат) на электрокатализ цитохрома P450 3A4. Как и антиоксидант таурин, этоксидол вызывает увеличение катодного тока электрохимического восстановления гемопротейна. Эффект имеет концентрационно-зависимый характер: 50 мкМ препарат увеличивает катодный ток на $110 \pm 3\%$, максимальное увеличение регистрируется при 180 мкМ концентрации этоксида и составляет $155 \pm 5\%$ [38, 39]. Этоксидол, в отличие от таурина, снижает N-деметилазную электрокаталитическую активность по отношению к экзогенному субстрату эритромицину (таблица).

Для сравнения антиоксидантной активности таурина и этоксида нами был использован метод амперометрического определения пероксида водорода с помощью иммобилизованного на электроде цитохрома с [40, 41]. Анализ показал, что этоксидол обладает большей антиоксидантной активностью по сравнению с таурином. Это свойство, по-видимому, и объясняет различное влияние таурина и этоксида на электроката-

литическую N-деметилазную активность цитохрома P450 3A4. Более сильный антиоксидант — этоксидол, разрушая пероксид водорода, блокирует пероксидазный путь модификации субстрата, что может выражаться в наработке меньшего количества продукта каталитической реакции — формальдегида при цитохром P450-зависимом электрокаталитическом N-деметилировании эритромицина.

Отмечено статистически значимое возрастание отношения концентраций 6β -гидрокортизола к кортизолу у пациентов на фоне курсового приема этоксида, что свидетельствует о повышении активности цитохрома P450 3A4 при применении этого антиоксидантного препарата по отношению к кортизолу как эндогенному субстрату этого изофермента семейства цитохромов P450 [39].

Таким образом, результаты анализа воздействия антиоксидантов на цитохром P450 3A4 позволяют сделать вывод о стимулирующей и протекторной роли этого класса биологически активных соединений на стадию электрохимического восстановления гемопротейна.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-04-91337).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zanger, U., and Schwab, M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation, *Pharmacol. Ther.*, **138**, 103–141.
- Guengerich, F.P. (2008) Cytochrome P450 and chemical toxicology, *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 70–83.
- Estabrook, R.W., Faulkner, K.M., Shet, M.S., and Fisher, C.W. (1996) Application of electrochemistry for P450-catalyzed reactions, *Methods Enzymol. B*, **272**, 44–51.
- Khatri, Y., Girhard, M., Romankiewicz, A., Urlacher, V.B., and Bernhardt, R. (2010) Regioselective hydroxylation of norisoprenoids by CYP109D1 from *Sorangium cellulosum* So ce56, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 485–495.
- Nebert, D.W., and Russel, D.W. (2002) Clinical importance of the cytochromes P450, *Lancet*, **360**, 1155–1162.
- Hrycaj, E.G., and Bandiera, S.M. (2012) The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450, *Arch. Biochem. Biophys.*, **522**, 71–89.
- Nowak, P., Wozniakiewicz, M., and Koscielniak, P. (2014) Simulation of drug metabolism, *Trends Anal. Chem.*, **59**, 42–49.
- Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., and Archakov, A.I. (2005) Electrochemical reduction of cytochrome P450 as an approach to the construction of biosensors and bioreactors, *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1051–1063.
- Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Suprun, E.V., Chalenko, Y.M., Vagin, M.Yu., Rudakov, Y.O., Shatskaya, M.A., and Archakov, A.I. (2011) Electrochemical investigations of cytochromes P450, *Biochem. Biophys. Acta*, **1814**, 94–101.
- Шумянцева В.В., Супрун Е.В., Булко Т.В., Добрынина О.В., Арчаков А.И. (2010) Сенсорные системы медицинского назначения на основе гемопротейнов и нанокompозитных материалов, *Биомедицинская химия*, **56**, 55–71.
- Шумянцева В.В., Булко Т.В., Кузнецова Г.П., Саменкова Н.Ф., Арчаков А.И. (2009) Электрохимия цитохромов P450: анализ вольтамперных характеристик электродов с иммобилизованными цитохромами P450 для поиска субстратов и ингибиторов, *Биохимия*, **74**, 542–549.
- Sadeghi, S., Ferrero, S., Di Nardo, G., and Gilardi, G. (2012) Drug–drug interactions and cooperative effects detected in electrochemically driven human cytochrome P450 3A4, *Bioelectrochemistry*, **86**, 87–91.
- Schneider, E., and Clark, D.S. (2013) Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, **39**, 1–13.
- Schenkman, J.B., and Jansson, I. (2003) The many roles of cytochrome b_5 , *Pharmacol. Ther.*, **97**, 139–152.
- Im, S.C., and Waskell, L. (2011) The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b_5 , *Arch. Biochem. Biophys.*, **507**, 144–153.
- Махова А.А., Шумянцева В.В., Ших Е.В., Булко Т.В., Кукес В.Г., Сизова О.С., Раменская Г.В., Арчаков А.И. (2010) Влияние витаминов группы В на монооксигеназную активность цитохрома P450 3A4: электроанализ каталитических свойств, *Биомедицина*, **3**, 96–98.

17. Makhova, A.A., Shumyantseva, V.V., Shich E.V., Bulko, T.V., Kukes, V.G., Sizova, O.S., Ramenskaya, G.V., Usanov, S.A., and Archakov, A.I. (2011) Electroanalysis of Cytochrome P450 3A4 catalytic properties with nanostructured electrodes: the influence of vitamin B group on diclofenac metabolism, *BioNanoScience*, **1**, 46–52.
18. Шумянцева В.В., Махова А.А., Булко Т.В., Ших Е.В., Кукес В.Г., Усанов С.А., Арчаков А.И. (2014) Влияние антиоксидантов на электрокаталитическую активность цитохрома P450 3A4, *Биомед. химия*, **60**, 224–234.
19. Махова А.А., Шумянцева В.В., Ших Е.В., Булко Т.В., Супрун Е.В., Кузиков А.В., Кукес В.Г., Арчаков А.И. (2013) Регуляция активности ферментов метаболизма лекарственных препаратов – цитохромов P450 3A4 и 2C9 – биологически активными соединениями, *Мол. медицина*, **5**, 49–53.
20. Kimura, Y., Ito, H., Ohnishi, R., and Hatano, T. (2010) Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity, *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 429–435.
21. Ших Е.В., Махова А.А. (2013) Экспериментальное обоснование возможности регуляции активности CYP450 3A4 таурином с целью оптимизации фармакотерапии антибиотиками-макролидами, *Биомедицина*, **4**, 169–173.
22. Asha, K.K., and Devadasan, K. (2013) Protective effect of taurine on the mitochondria of albino rats induced with fulminant hepatic failure, *Biomedicine & Preventive Nutrition*, **3**, 279–283.
23. Das, J., Ghosh, J., Manna, P., and Sil, P. (2013) Taurine protects acetaminophen-induced oxidative damage in mice kidney through APAP urinary excretion and CYP2E1 inactivation, *Toxicology*, **269**, 24–34.
24. Matsuda, H., Kinoshita, K., Sumida, A., Takahashi, K., Fukuen, S., Fukuda, T., Takahashi, K., Yamamoto, I., and Azuma, J. (2002) Taurine modulates induction of cytochrome P450 3A4 mRNA by rifampicin in the HepG2 cell line, *Biochim. Biophys. Acta*, **1593**, 93–98.
25. Bard, A.E., and Faulkner, L.R. (1980) *Electrochemical methods. Fundamental and applications*, John Wiley & Sons, NY.
26. Tang, C., Fang, Y., Booth-Genthe, C., Kuo, Y., Kuduk, S., Rushmore, T., and Carr, B. (2007) Diclofenac hydroxylation in monkeys: efficiency, regioselectivity, and response to inhibitors, *Biochem. Pharmacol.*, **73**, 880–890.
27. Sucheta, A., Cammack, R., Weiner, J., and Armstrong, F.A. (1993) Reversible electrochemistry of fumarate reductase immobilized on an electrode surface. Direct voltammetric observations of redox centers and their participation in rapid catalytic electron transport, *Biochemistry*, **32**, 5455–5465.
28. Iwuoha, E.I., Williams-Dottin, A.R., Hall, L.A., Morrin, A., Mathebe, G.N., Smyth, M.R., and Killard, A. (2004) Electrochemistry and application of a novel monosubstituted squarate electron-transfer mediator in a glucose oxidase-doped poly(phenol) sensor, *Pure Appl. Chem.*, **76**, 789–799.
29. Welsh, O., Vera-Cabrera, L., and Welsh, E. (2010) Onychomycosis, *Clin. Dermatol.*, **28**, 151–159.
30. Hisaka, A., Ohno, Y., Yamamoto, T., and Suzuki, H. (2010) Prediction pharmacokinetic drug-drug caused by changes in cytochrome P450 activity using in vivo information, *Pharmacol. Ther.*, **125**, 230–248.
31. Lewis, D.F.V. (2001) *Guide to cytochrome P450. Structure and function*, Taylor and Francis, London and NY, pp. 132–139.
32. Метелица Д.И. (1982) *Активация кислорода ферментными системами*, Наука, Москва, с. 94–104.
33. Archakov, A.I., and Bachmanova, G.I. (1990) *Cytochrome P450 and active oxygen*, Taylor and Francis, London, pp. 185–207.
34. Жуков А.А., Арчаков А.И. (1985) Стехиометрия реакций митохондриального окисления. Распределение редокс-эквивалентов между монооксигеназными и оксидазными реакциями, катализируемыми цитохромом P-450, *Биохимия*, **50**, 1939–1952.
35. Yasui, H., Hayashi, S., and Sakurai, H. (2005) Possible involvement of singlet oxygen species as multiple oxidants in p450 catalytic reactions, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **20**, 1–13.
36. Guengerich, F.P. (1978) Destruction of heme and hemo-proteins mediated by liver microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase, *Biochemistry*, **17**, 3633–3639.
37. Сизова О.С., Потеев Н.Н., Жуковский Р.О., Ших Е.В. (2011) Возможности снижения гепатотоксичности итраконазола при комбинированном назначении с таурином у больных онихомикозом, *Клиническая дерматология и венерология*, **1**, 45–49.
38. Кукес В.Г., Шумянцева В.В., Булко Т.В., Арчаков А.И. (2013) Влияние антиоксидантного препарата этоксида на электрохимическое восстановление цитохромов P450 3A4, 2C9, 2D6, *Лекарственные препараты и рациональная фармакотерапия*, **3**, 7–13.
39. Отделенов В.А., Смирнов В.В., Дмитриев А.В., Поройков В.В., Шумянцева В.В., Красных Л.М., Сычев Д.А., Кукес В.Г. (2013) Влияние этилметилгидроксипиридина малата на активность CYP3A4: комплексный подход к оценке влияния на систему биотрансформации лекарственных средств, *Лекарственные препараты и рациональная фармакотерапия*, **3**, 30–36.
40. Rudakov, Yu.O., Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Suprun, E.V., Kuznetsova, G.P., Samenkova, N.F., and Archakov, A.I. (2008) Stoichiometry of electrocatalytic cycle of cytochrome P450 2B4, *J. Inorg. Biochem.*, **102**, 2020–2025.
41. Krylov, A.V., Beissenhirtz, M., Adamzing, H., Scheller, F.R., and Lisdat, F. (2004) Thin-film electrodes for measurement of superoxide and hydrogen peroxide protein-electrode, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 1327–1330.

**TAURINE MODULATES CATALYTIC ACTIVITY
OF CYTOCHROME P450 3A4**

**V. V. Shumyantseva^{1*}, A. A. Machova², T. V. Bulko,
R. Bernhardt³, A. V. Kuzikov¹, E. V. Shich²,
V. G. Kukes², A. I. Archakov¹**

¹ *V. N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry,
ul. Pogodinskaya 10, Moscow 119121, Russia; fax: + 7(495)245-0857,
E-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru*

² *I. M. Sechenov First Moscow State Medical University,
ul. Bolshaya Pirogovskaya 2, str. 4, Moscow 119991, Russia*

³ *Institute for Biochemistry, Saarland University,
Saarbrücken 66123, Germany*

Received October 3, 2014

Revision received November 25, 2014

Influence of biologically active compound of taurine on stability and catalytic properties of the heme protein cytochrome P450 3A4 was investigated. The catalytic activity was analyzed by electrochemical methods (by means of cyclic and square wave voltammetry) with use of the cytochrome P450 3A4 immobilized on an electrode. We show that taurine in the range of concentration of 10-70 μM stimulates electrochemical reduction of cytochrome P450 3A4 and at concentration 50 μM the effect has its maximum value ($115 \pm 3\%$). Enzyme inhibition by itraconazole was attenuated in the presence of taurine. Taurine was shown to have protective functions in relation to cytochrome P450 3A4, stabilizing the enzyme during electrolysis at a controlled potential in the presence of a substrate erythromycin, which is expressed as increase in "residual" reduced form of the heme protein (52 ± 5 and $71 \pm 8\%$, respectively).

Key words: cytochrome P450, antioxidants, drug metabolism, bioelectrochemistry, taurine