

ИНГИБИТОРЫ ГАЛАКТОНОЛАКТОНОКСИДАЗЫ ИЗ *Trypanosoma cruzi* НА ОСНОВЕ АЛЛИЛПОЛИАЛКОКСИБЕНЗОЛОВ

© 2023 А.А. Чудин¹, И.Д. Злотников¹, С.С. Крылов², В.В. Семенов², Е.В. Кудряшова^{1*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: helenakoudriachova@yandex.ru

² Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.11.2022

После доработки 20.12.2022

Принята к публикации 20.12.2022

Ингибирование путей биосинтеза соединений, жизненно необходимых *Trypanosoma cruzi*, рассматривается исследователями как один из возможных механизмов действия потенциальных лекарств против болезни Шагаса. В качестве одного из таких механизмов нами рассматривается ингибирование галактонолактонооксидазы из *T. cruzi* (TcGAL), катализирующей финальную стадию синтеза витамина С – антиоксиданта, который *T. cruzi* не способна усваивать извне и должна синтезировать сама. В данной работе впервые найден класс эффективных ингибиторов TcGAL – растительные аллилбензолы. Обнаружено, что природные аллилполиалкоксисбензолы (АПАБ) – апиол, диллапиол и др. являются эффективными ингибиторами TcGAL с $IC_{50} = 20–130$ мкМ; установлен неконкурентный механизм действия апиола. Найдено, что конъюгирование АПАБ с трифенилфосфонием, обеспечивающим селективную доставку биологически активных веществ в митохондрии, позволяет повысить эффективность и/или максимальный процент ингибирования по сравнению с немодифицированными АПАБ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: галактонолактонооксидаза, болезнь Шагаса, ингибиторы, апиол, аллилполиалкоксисбензолы, трифенилфосфиновые производные, диллапиол, миристицин, эвгенол, эстрагол.

DOI: 10.31857/S0320972523010074, EDN: PCFZWJ

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Шагаса – заболевание, вызываемое простейшим организмом-паразитом *Trypanosoma cruzi*. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, примерно 6–7 млн человек во всем мире инфицированы *T. cruzi* и ещё 75 млн человек находятся в зоне риска. В настоящее время заболевание лечится всего двумя препаратами: бензнидазолом и нифуртимоксом, которые действуют как пролекарства, активируясь внутри организма паразита митохондриальной NADH-зависимой нитроредуктазой I-типа. В основе действия обоих препаратов лежит восстановление их нитрогруппы до аминогруппы с образованием различных промежуточных свободных радикалов и электрофильных метаболитов. Однако у данных лекарств есть ряд серьёзных недо-

статков, в том числе эффективность только на острой или ранней фазе инфекции, побочные эффекты в течение курса приёма и развивающаяся устойчивость паразита к используемым препаратам [1].

Одним из перспективных направлений поиска лекарств против болезни Шагаса являются исследования, посвящённые ингибированию биосинтеза соединений, жизненно необходимых *T. cruzi*. Например, Lepesheva et al. [2] рассматривают стерол-14 α -деметилазу, участвующую в биосинтезе стеролов (необходимы для нормального функционирования мембран), как потенциальную мишень для терапии болезни Шагаса. Так, использование противогрибковых азолов, которые блокируют биосинтез стеролов, оказалось очень успешным против одноклеточных паразитов: позаконазол, препарат класса триазолов, в настоящее время

Принятые сокращения: АОТ – ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты; АПАБ – аллилполиалкоксисбензолы; АТМБ – аллилтетраметоксисбензол; ПАВ – поверхностно-активные вещества; ТФФ – трифенилфосфоний; TcGAL – галактонолактонооксидаза из *Trypanosoma cruzi*.

* Адресат для корреспонденции.

вступает в фазу II клинических испытаний для лечения болезни Шагаса.

В рамках данной работы мы рассматриваем ингибирование биосинтеза другого жизненно важного для *T. cruzi* соединения – витамина С, антиоксиданта, который трипаносома не может усваивать извне и должна синтезировать самостоятельно [3]. В качестве потенциальной мишени для разработки лекарства нами была выбрана галактонолактонооксидаза из *T. cruzi* (TcGAL), катализирующая финальную стадию синтеза витамина С из L-галактоно-1,4-лактона. Ввиду отсутствия галактонолактонооксидазы в организме человека соответствующий ингибитор может рассматриваться как потенциально селективное лекарство против болезни Шагаса. Недавно был обнаружен антипаразитарный эффект природного алколоида, ликорина, против *T. cruzi* [4], однако молекулярная мишень и механизм действия не установлен. Нами продемонстрировано, что ликорин оказывает ингибирующий эффект на TcGAL [5], однако эффективность ингибирования TcGAL ликорином на 2 порядка ниже в сравнении с таковой в отношении самой *T. cruzi*, что говорит о низкой доступности фермента для ликорина в организме. Либо ликорин действует на другую мишень в *T. cruzi*, либо на фермент действует не сам ликорин, а его метаболиты.

Другим перспективным классом соединений в качестве предполагаемых ингибиторов TcGAL являются халконы, содержащие общий бензодиоксольный фрагмент. Показано, что ряд соединений группы халконов из гречишника *Polygonum salicifolium* проявляют антитрипаносомную активность [6] и потенциально применимы для лечения целого ряда трипаносомных инфекций. В настоящей работе рассматривается группа халконов, некоторые представители которой, например, 2',4'-дигидрокси-6'-метоксихалконы, подавляют рост *T. cruzi* в концентрации 20 мкМ и менее [7].

В качестве перспективной группы соединений в представленной работе рассматриваются природные аллилполиалкоксобензолы (АПАБ), компоненты экстрактов растительного сырья (например, *Anethum graveolens* L. и *Petroselinum sativum* Hoffm.), обладающие разнообразной биологической активностью, в том числе противовоспалительной, противомикробной и др. [8, 9]. В частности, диллапиол (основной компонент экстракта листьев *Piper aduncum*) обладает антилейшманийной активностью с $IC_{50} = 60$ мкМ [10]. Можно предположить, что диллапиол и, возможно, другие АПАБ будут проявлять антитрипаносомную активность.

Следует также учитывать, что антитрипаносомный эффект потенциальных ингибиторов *T. cruzi* может быть усилен посредством модификации АПАБ, в частности, их конъюгирования с трифенилфосфонием (ТФФ), обеспечивающим селективную доставку биологически активных веществ в митохондрии за счёт внутреннего отрицательного трансмембранного потенциала [8]. Известно, что аккумулярование конъюгатов ряда соединений с ТФФ в митохондриях позволяет усилить их антибактериальную активность, что, в частности, показано в отношении *Bacillus subtilis* [11].

Таким образом, целью данной работы является изучение влияния АПАБ на активность галактонолактонооксидазы из *T. cruzi* для разработки новых лекарств против болезни Шагаса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. D-арабиноно-1,4-лактон, 2,6-дихлорфенолиндифенол, натриевая соль ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты (АОТ), компоненты буферных растворов, н-октан и ацетонитрил («Sigma-Aldrich», США); феназинметасульфат («Merck», Германия); ликорин («Aladdin», Китай); эвгенол («Acros Organics», Бельгия). Халконы были любезно предоставлены сотрудниками ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН (Москва, Россия).

Рекомбинантная экспрессия TcGAL. Рекомбинантную экспрессию галактонолактонооксидазы (EC 1.3.3.12) из *T. cruzi* (TcGAL) в *Escherichia coli* проводили согласно методике, описанной ранее [3]. Вкратце, для продукции фермента клетки *E. coli* BL21 (DE3), несущие плазмиду pBAD-TcGAL (любезно предоставлена проф. W.J.H. van Berkel (Вагенингенский университет, Нидерланды)), выращивали в среде LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина до достижения $A_{600} \sim 0,6$. Экспрессию TcGAL индуцировали добавлением 0,02% L-арабинозы, и продолжали инкубацию в течение 16 ч при 28 °С.

Рефолдинг телец включения TcGAL. Рефолдинг TcGAL проводили согласно методике, описанной ранее [3]. Нерастворимый материал, собранный после лизиса клеток, промывали 6%-ным Triton X-100, содержащим 60 мМ ЭДТА и 1,5 М NaCl (pH 7,0), и растворяли в 6 М гуанидин хлориде. Затем денатурант удаляли диализом против 10 мМ фосфата натрия (pH = 8,0). После диализа суспензию агрегированного белка вводили в систему обращённых мицелл вода-АОТ-октан, степень гидратации $W_0 = 30$ достигали добавлением

10 мМ фосфата натрия (рН 8,8). Окисленный и восстановленный растворы глутатиона (100 мМ GSSG и 300 мМ GSH) в 10 мМ фосфате натрия (рН 8,8) смешивали, и аликвоту 10 мкл добавляли к 1 мл мицеллярного раствора фермента в 0,4 М АОТ. Рефолдинг фермента инициировали добавлением аликвоты (10 мкл) раствора FAD в воде (10-кратный молярный избыток по отношению к концентрации фермента). Конечная концентрация белка в мицеллах составляла 1–2 мг/мл.

Экстракция и очистка апиола и диллапиола. Выделение и очистку растительных апиола и диллапиола проводили согласно методике, описанной Tsyanov et al. [8]. Вкратце, экстракцию семян петрушки и укропа жидким CO₂ осуществляла компания ООО «Караван» (Краснодар, Россия). Апиол, диллапиол и миристицин чистотой 98–99% получены высокоэффективной перегонкой CO₂-экстрактов на опытно-промышленной установке в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (Москва, Россия).

Синтез конъюгатов с трифенилфосфонием и пропильтрифенилфосфония. Конъюгаты апиола, диллапиола и аллилтетраметоксibenзола с трифенилфосфонием, а также пропильтрифенилфосфоний (пропил–ТФФ) были получены согласно методике, описанной Tsyanov et al. [8].

Определение параметров ингибирования TcGAL для исследуемых органических соединений. Для спектрофотометрического измерения активности фермента использовали методику с применением системы обращённых мицелл поверхностно-активных веществ (ПАВ), предложенную в работе Chudin et al [5]. Вкратце, использовали комбинацию 120 мкМ феназинметосульфата в ацетонитриле в качестве электроноакцептора и 120 мкМ водный раствор 2,6-дихлорфенолиндифенола в качестве красителя, обесцвечивающегося при образовании аскорбата при длине волны 550 нм. Поглощение измеряли с помощью спектрофотометра Ultrospec-2100 pro («Amersham biosciences», США). В качестве среды использовали систему обращённых мицелл 0,1 М АОТ. Концентрации TcGAL и D-арабиноно-1,4-лактона поддерживали постоянными (34 нМ и 1 мМ соответственно). Концентрацию раствора субстрата D-арабиноно-1,4-лактона перед измерением активности уточняли с помощью КД-спектрометра Jasco J-815 («JASCO», Япония). Во всех опытах по измерению активности TcGAL (эффекта ингибирования) использовали вышеописанную методику с приведёнными условиями и концентрациями, если не указано иного. Запасные растворы ингибиторов готовили в

75%-ном этаноле, кроме ликорина, который растворяли в дистиллированной воде. Для построения графиков и статистической обработки данных с использованием *t*-критерия Стьюдента применяли программу SigmaPlot 11.1. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение трёх независимых экспериментов.

ИК-спектроскопия Фурье. ИК-спектры в режиме нарушенного полного внутреннего отражения регистрировали с помощью прибора Bruker Tensor 27, оснащённым детектором МСТ, охлаждаемым жидким азотом («Bruker», Германия). Образцы помещали в термостатируемую ячейку BioATR-II с элементом ZnSe ATR («Bruker»). ИК-спектры регистрировали в диапазоне 900–3000 см⁻¹ со спектральным разрешением 1 см⁻¹. Для каждого спектра накапливалось 50 сканов со скоростью 20 кГц и усреднялось. Спектральные данные обрабатывались с использованием программной системы Bruker Opus 8.2.28 («Bruker»), которая включает коррекцию базовой линии и атмосферную компенсацию.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Применение системы обращённых мицелл для изучения ингибирования TcGAL. Изучение ингибирования TcGAL до недавнего времени представлялось невозможным, поскольку TcGAL – митохондриальный мембранный фермент, образующий тельца включения и не сворачивающийся в водной среде. Впервые провести сворачивание и измерить активность TcGAL удалось с помощью предложенного нами метода, основанного на применении систем обращённых мицелл (модели биомембран) [3]. Ингибиторный анализ TcGAL впервые был осуществлён в нашей работе [5] на примере ликорина – природного алкалоида, который подавляет рост микроорганизма *T. cruzi*, однако молекулярная мишень, на которую действует ликорин, неизвестна [4]. В работе Chudin et al. [5] нами была разработана методика проведения ингибиторного анализа для TcGAL и обнаружен ингибирующий эффект ликорина, а в настоящей работе мы применили разработанный подход для анализа ряда соединений других классов – потенциальных ингибиторов TcGAL. Следует подчеркнуть, что обращённые мицеллы являются релевантными моделями митохондриальных мембран. Известно, что мембраны митохондрий часто содержат небислойные липидные структуры, которые представляют

собой ассоциаты молекул липидов, построенные по типу обращённых мицелл, заключённых между монослоями двухслойной мембраны. С участием такого рода небислойных липидных структур осуществляются слияние и компартментализация мембран, экзоцитоз, трансмембранный перенос и др. [12].

Ключевым параметром системы обращённых мицелл являются размеры их внутренней полости, которые можно регулировать, варьируя степень гидратации W_0 , определяемую мольным соотношением воды и ПАВ [12]. Максимальная активность ферментов в мицеллярных системах наблюдается при степени гидратации W_0 , когда размер внутренней полости мицеллы соответствует геометрическим параметрам сольбилизируемого фермента. В случае олигомерных ферментов на зависимостях каталитической активности от W_0 наблюдаются несколько оптимумов (колоколообразный вид), которые соответствуют функционированию отдельных олигомерных форм фермента, обладающих каталитической активностью [13].

Профиль зависимости активности TcGAL от степени гидратации мицелл, как и других олигомерных ферментов, также имеет колоколообразный вид и характеризуется двумя оптимумами при степенях гидратации $W_0 = 21$ – 22 и $W_0 = 27$ – 29 (рис. 1, а). Каталитические параметры TcGAL в оптимумах активности представлены на рис. 1, б. Полученные данные согласуются с полученными ранее в работе Kudryashova et al. [3], где было установлено, что оптимумы активности в указанных интервалах степеней гидратации W_0 соответствуют функционированию мономерной и димерной форм фермента.

Эффективность ингибирования TcGAL ликорином в случае мономерной и димерной

форм фермента практически не отличается [5], поэтому изучение влияния действия потенциальных ингибиторов в данной работе проводилось при степени гидратации $W_0 = 22$, соответствующей мономерной форме TcGAL, которая обладает наибольшей активностью.

Влияние аллилполиалкоксибензолов (АПАБ) на активность TcGAL. В данной работе изучено влияние АПАБ на активность TcGAL, а именно: апиола, диллапиола, миристицина, аллилтетраметоксibenзола (АТМБ), эвгенола, эстрагола, аллилбензола, различающихся количеством и положением метоксигрупп и наличием метилendioкси-группы, а также их конъюгатов с ТФФ (табл. 1).

Следует отметить, что ингибирующий эффект АПАБ начинает проявляться уже при концентрациях порядка 20–50 мкМ, что на порядок ниже, чем для ликорина (300 мкМ) (рис. 2 и табл. 1).

При сравнении диллапиола, апиола, миристицина и АТМБ, различающихся числом и положением метоксигрупп (табл. 1), корреляции между количеством метоксигрупп и активностью ингибитора не выявлено. Наибольший ингибирующий эффект среди АПАБ оказывает диллапиол. Апиол и сходный с ним по положению боковых «метоксигрупп» АТМБ оказывают сравнимое ингибирующее действие (значения IC_{50} составляют 50 мкМ и 65 мкМ соответственно), что свидетельствует о необязательном наличии метилendioкси-группы для подавления активности TcGAL. Миристицин, содержащий три метокси-заместителя в бензольном кольце, характеризуется значительно более высоким значением IC_{50} по сравнению с тетразамещёнными АПАБ. Полученные данные указывают на то, что на ингибирование влияет аллильный фрагмент

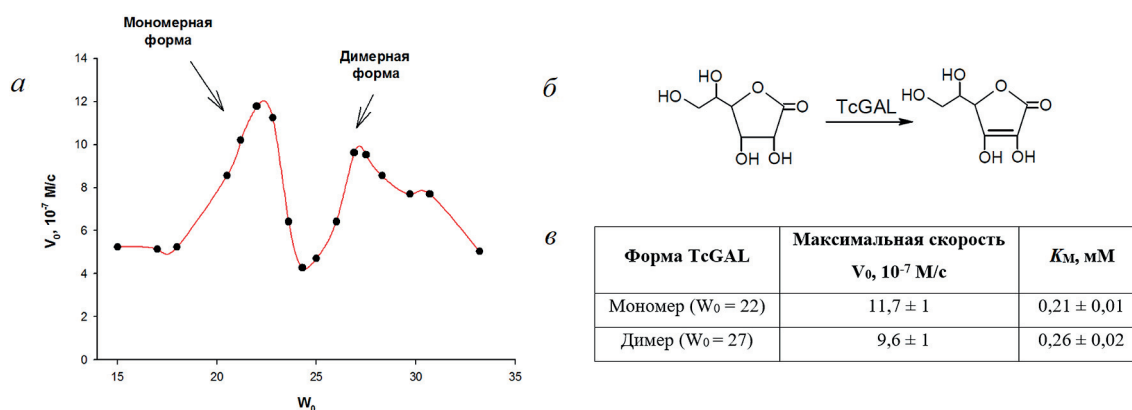


Рис. 1. Характеристики TcGAL в системе обращённых мицелл АОТ. а – Каталитический профиль активности TcGAL в системе мицелл АОТ (зависимость максимальной скорости V_0 от степени гидратации W_0); б – реакция, катализируемая TcGAL; в – каталитические параметры TcGAL для мономерной и димерной форм. Параметры имеют максимальную погрешность 15%

Таблица 1. Ингибирование TcGAL исследуемыми соединениями

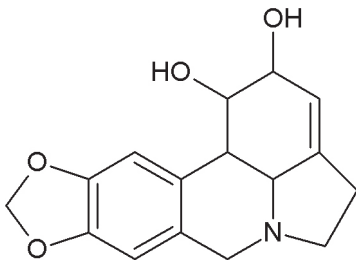
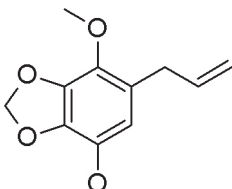
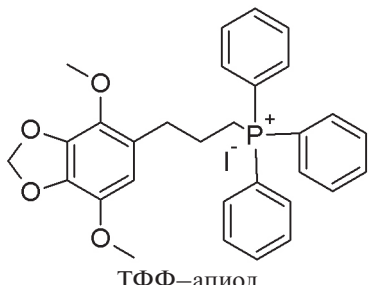
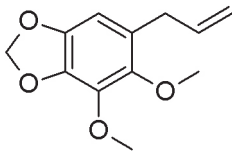
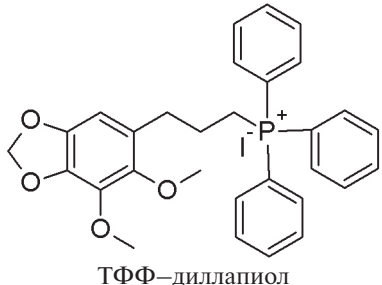
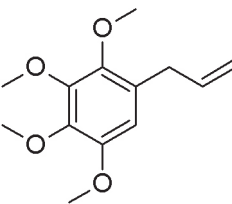
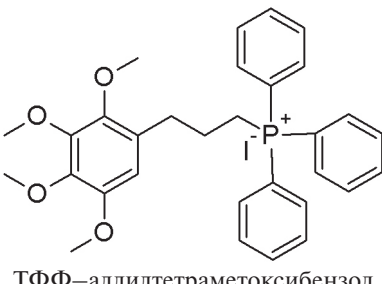
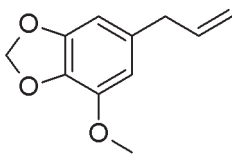
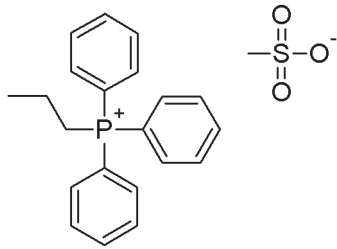
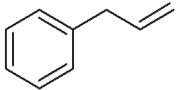
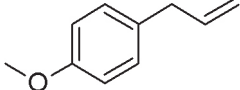
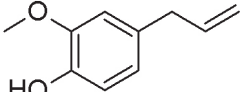
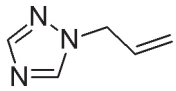
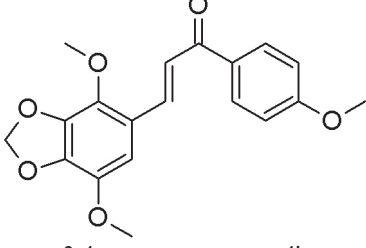
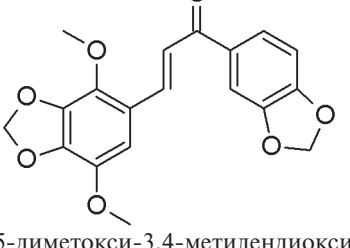
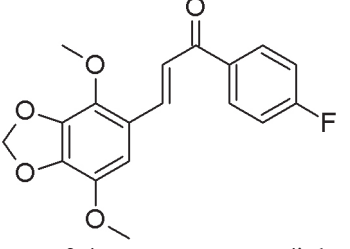
Соединение		Ингибирование TcGAL, IC ₅₀ , мкМ	
 Ликорин		450	
Аллилполиалкокксибензолы			
Соединение	Ингибирование TcGAL, IC ₅₀ , мкМ	Соединение	Ингибирование TcGAL, IC ₅₀ , мкМ
 Апиол	50	 ТФФ–апиол	95
 Диллапиол	20	 ТФФ–диллапиол	35
 Аллилтетраметоксибензол	65	 ТФФ–аллилтетраметоксибензол	40
 Миристицин	130	 Пропил–ТФФ	275

Таблица 1. (продолжение)

Аллилбензол и его аналоги	
Соединение	Ингибирование TcGAL, IC ₅₀ , мкМ
 Аллилбензол	60
 Эстрагол	20
 Эвгенол	10
 1-аллил-1,2,4-триазол	75
Халконы	
Соединение	Ингибирование TcGAL
 2,5-диметокси-3,4-метилендиокси-4'-метоксихалкон	макс. ингибирование ≈ 25% (при 500 мкМ)
 2,5-диметокси-3,4-метилендиокси-4',5'-метилендиоксихалкон	макс. ингибирование ≈ 16% (при 500 мкМ)
 2,5-диметокси-3,4-метилендиокси-4'-фторхалкон	нет ингибирования

и донорно-акцепторные и стерические факторы заместителя в аллилбензоле.

Следует отметить, что $IC_{50} = 20$ мкМ, найденное для диллапиола в отношении TcGAL, сопоставимо с IC_{50} данного соединения в отношении *Leishmania brasiliensis* (относящейся к трипаносоматидам) (60 мкМ, согласно Parise-Filho et al. [10]). С учётом распределения ингибитора в самих клетках и большей доступности ингибитора для фермента в экспериментах *in vitro* более низкое значение IC_{50} диллапиола в отношении самого фермента представляется логичным. Полученные данные указывают на то, что TcGAL, вероятно, является ферментом-мишенью, на который действует данный ингибитор в организме трипаносоматид.

Согласно литературным данным [8], конъюгирование трифенилфосфония с биологически активными молекулами обеспечивает селективную доставку последних в митохондрии, поэтому конъюгирование ТФФ с апиолом и диллапиолом — ингибиторами митохондриального мембранного фермента TcGAL — могло бы усилить ингибирующий эффект. Оказалось, что максимальный процент ингибирования TcGAL ТФФ-конъюгатами апиола и диллапиола на 10–15% выше, чем немодифицированными молекулами (рис. 2, а). Конъюгирование АТМБ с ТФФ приводит и к заметному снижению IC_{50} . Интересно, что сам пропилен-ТФФ (контрольный образец) также оказывает ингибирующий эффект в отношении TcGAL с $IC_{50} = 275$ мкМ (табл. 1 и рис. 2, б), то есть в гораздо более высокой концентрации, чем АПАБ (IC_{50} порядка 50–70 мкМ). Предположительно, ТФФ в основном влияет на распределение ингибитора в мицеллярной системе и его пространственную ориентацию на поверхности раздела фаз, где располагается TcGAL. Положительный заряд ТФФ может способствовать

концентрированию конъюгатов на отрицательно заряженной поверхности раздела фаз, образованной молекулами АОТ.

Распределение ингибиторов АПАБ и их ТФФ-конъюгатов, а также пространственная ориентация функциональных групп в системе обращённых мицелл. Для выяснения расположения и пространственной ориентации функциональных групп изучаемых ингибиторов в мицеллах использован метод ИК-спектроскопии Фурье. На рис. 3 представлены ИК-спектры диллапиола, АТМБ, пропилен-ТФФ и ТФФ-диллапиола в системе обращённых мицелл АОТ и в контрольных системах «водная фаза» (вода-этанол) и «органическая фаза» (октан). В табл. 2 указаны положения характеристических пиков функциональных групп и их преимущественное микроокружение.

В мицеллярной системе микроокружение метилendioкси-группы и метоксигрупп диллапиола (рис. 3, а), а также тетраметоксibenзольного фрагмента АТМБ (рис. 3, б) в большей степени соответствует водной фазе, следовательно, в системе обращённых мицелл АОТ данные соединения направлены во внутреннюю полость мицелл. Аллильный радикал данных ингибиторов закорен на поверхности раздела фаз, окружён гидрофобными цепями мицелл, согласно изменениям в полосе при 1645 см^{-1} , характерной для колебаний $C=C$ аллильной группы. Пропилен-ТФФ (рис. 3, в; контрольное соединение) в мицеллах распределён между водной и органической фазой. ТФФ-диллапиол (рис. 3, г): микроокружение молекулы в мицеллярной системе соответствует в большей степени водной фазе (табл. 2), что обуславливает высокую степень загрузки ТФФ-диллапиол внутрь мицелл и их относительно высокую подвижность, вероятно, поэтому ТФФ-диллапиол не превосходит по ингибирующей способности

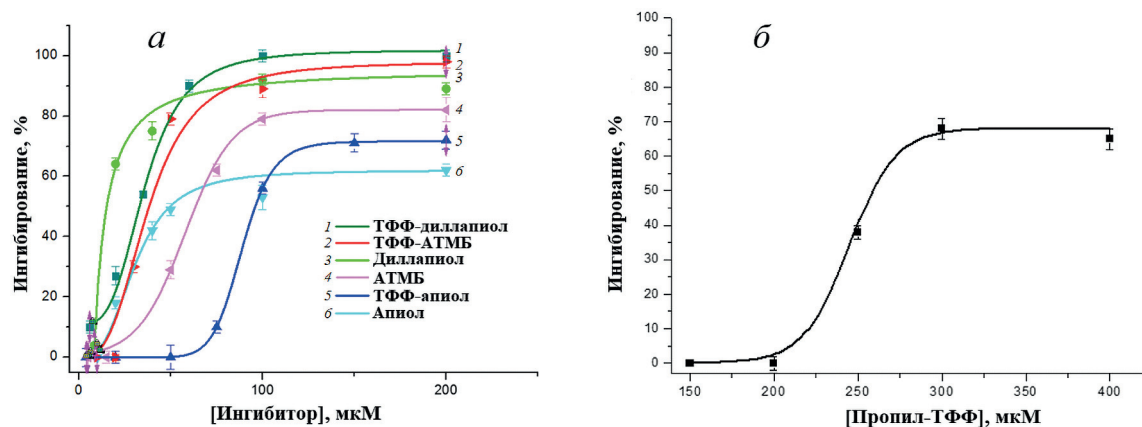


Рис. 2. Ингибирующий эффект TcGAL соединениями класса АПАБ. а — Сравнение ингибирующего эффекта диллапиола, ТФФ-диллапиола, аллилтетраметоксibenзола, ТФФ-аллилтетраметоксibenзола, апиола и ТФФ-апиола; б — зависимость ингибирующего эффекта от концентрации пропилен-ТФФ

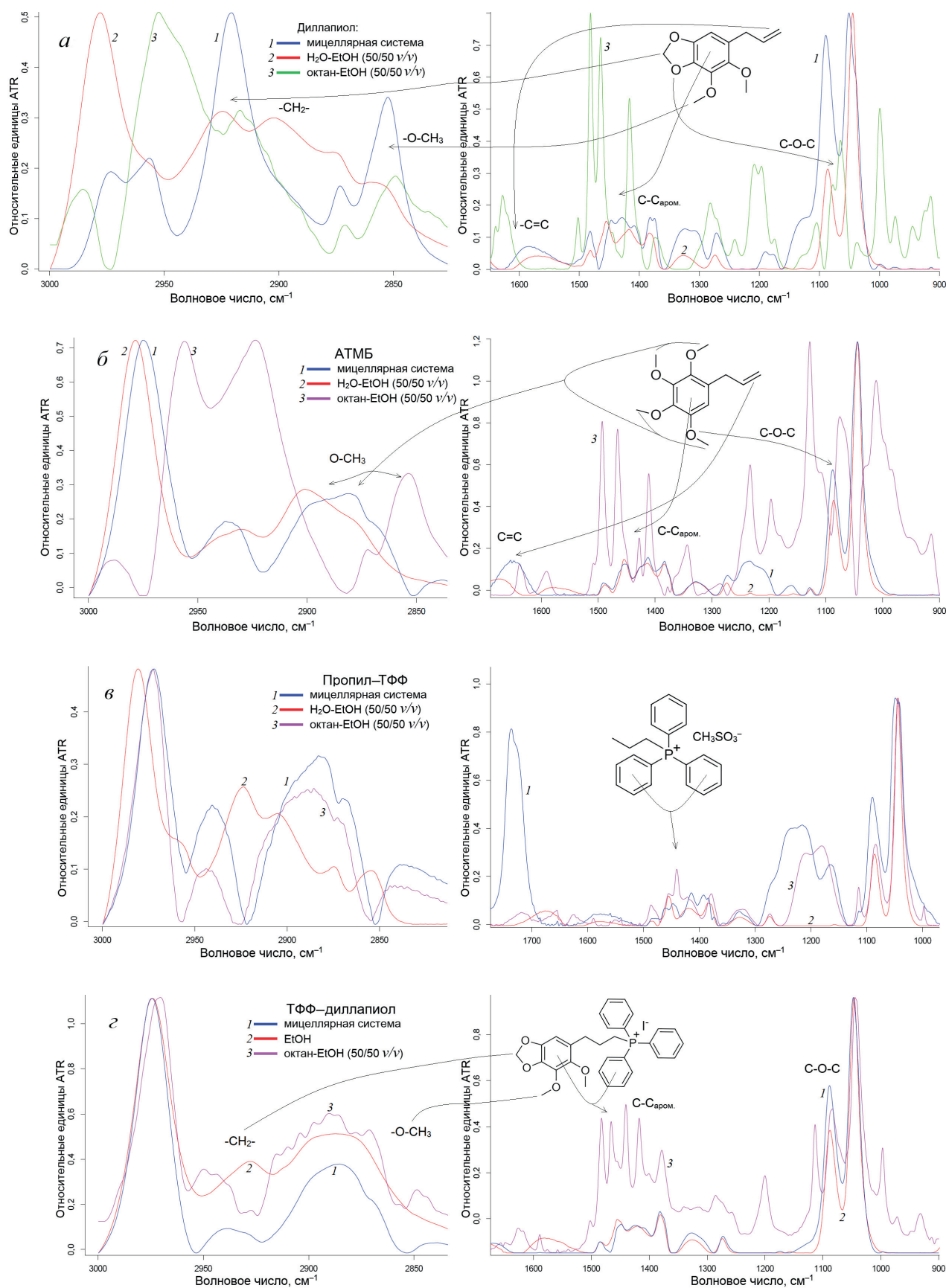
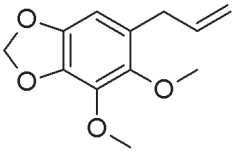
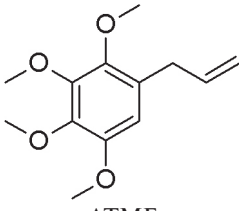
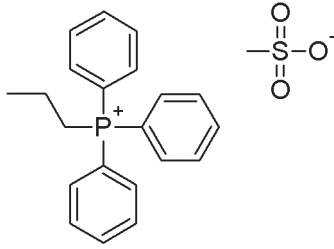
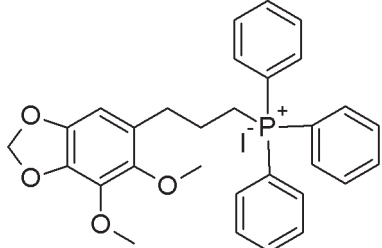
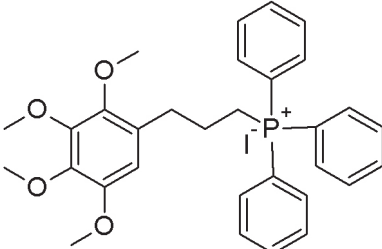


Рис. 3. ИК-спектры Фурье в режиме НПВО в мицеллах, водно-этанольном, октан-этанольном окружении: диллапиола (а); аллитетраметоксibenзола (б), пропил-ТФФ (в), ТФФ-диллапиол (г). ИК-спектры нормированы на интенсивность мажорного пика. $T = 22^\circ\text{C}$. Система обращённых мицелл: 0,1 М АОТ в октане ($W_0 = 22$)

Таблица. 2. Положения характеристических пиков в ИК-спектрах диллапиола, аллилтетраметоксibenзола, пропил-ТФФ, ТФФ-диллапиола, ТФФ-аллилтетраметоксibenзола; соответствие функциональных групп и их микроокружения в мицеллах АОТ

Соединение	Функциональная группа	Положение характеристического пика в ИК-спектре, см ⁻¹			Вывод о расположении функциональной группы и молекулы
		октан-этанол 50/50 (v/v)	вода-этанол 50/50 (v/v)	мицеллы АОТ	
 Диллапиол	O—CH ₂ —O	2917	2924	2921	метилendioкси-группа в большей степени ориентирована внутрь мицелл и гидрофильное окружение
	=C—O—C	1065	1045	1051	
	—O—CH ₃	2848,5	2858	2853	ароматическое ядро расположено на поверхности раздела фаз
	C—C ароматические	1464	1448	1454	
 АТМБ	Ph—CH ₂ —CH=CH ₂	2956	2930	2937	расположение преимущественно внутри мицелл АОТ; ароматические группы частично внутри мицелл и частично между гидрофобными СН ₂ -цепями ПАВ
	—O—CH ₃	2924	2901	2880—2900	
	C—C ароматические	1492 и 1466	1488,5 и 1449—1456	1491—1488 и 1454	
 Пропил-ТФФ	C—C ароматические	1421	1414—1420	1413	молекула расположена в основном на поверхности раздела фаз между гидрофобными цепями ПАВ
		1440 и 1455	1455	1448 и 1458—1462	
 ТФФ-диллапиол	O—CH ₂ —O	2937—2952	2927—2932 (2928)	2927—2947	молекулы на поверхности раздела фаз и внутри мицелл; метилendioкси-группа ориентирована внутрь мицелл, а положительно заряженный ТФФ электростатически взаимодействует с сульфогруппами АОТ
	=C—O—C	1082—1087	1086 (1088)	1088	
	—O—CH ₃	2848	—	2840	
	Ph—CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ —PPh ₃	2970	2981 (2974)	2981	
	C—C ароматические	1502	1485	1485	
		1455 и 1465	1448—1457	1448	
 ТФФ-аллилтетраметоксibenзол	=C—O—C	1086	1089 (1088)	1069 и 1113	тетраметоксibenзольный фрагмент на поверхности раздела фаз; ТФФ-радикал на поверхности раздела фаз и частично в октано
	—O—CH ₃	2855	2900 (2880—2900)	2855 и 2873	
	Ph—CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ —PPh ₃	2993 и 2957	2980 (2974)	2990 и 2957	
	C—C ароматические	1467	1482—1488	1467 и 1495	

сам диллапиол (но максимальный процент ингибирования у ТФФ–диллапиола повышен за счёт более выгодного распределения вещества в мицеллах). Положение пиков ТФФ–АТМБ в мицеллярной системе (табл. 2) свидетельствует о том, что окружение тетраметоксибензола — преимущественно гидрофильное, а ТФФ-фрагмент расположен на поверхности раздела фаз, что обуславливает заякоривание в мицеллярной матрице и пространственную ориентацию ТФФ–АТМБ в сравнении с АТМБ. Усиление ингибирующего действия АТМБ после конъюгирования с ТФФ может быть обусловлено локализацией мембранного фермента TcGAL на поверхности раздела фаз. В случае исходного диллапиола эффект заякоривания в мицеллярной матрице не выражен.

Влияние аллилбензола и его аналогов на активность TcGAL. Поскольку АПАБ и ликорин, содержащие общий бензодиоксольный фрагмент, но отличающиеся остальной частью (в молекуле ликорина вместо аллильного радикала присутствует жёсткий объёмный блок (табл. 1)), проявляют разный по силе ингибирующий эффект в отношении TcGAL, целесообразно изучить роль аллильной группы в обеспечении ингибирующего действия АПАБ на этот фермент. В связи с этим мы исследовали влияние аллилбензола и его аналогов, не содержащих метилendioкси-группы, на активность TcGAL (рис. 4).

Найдено, что значение IC_{50} для аллилбензола сравнимо с таковым для апиола (60 и 50 мкМ соответственно), это говорит о важной роли аллильной группы в ингибировании TcGAL даже при отсутствии метилendioкси-группы. Значения IC_{50} для 1-аллил-1,2,4-триазола и апиола также сопоставимы (75 мкМ и 50 мкМ соот-

ветственно), что тоже подтверждает значимую роль именно аллильной части молекулы в ингибировании TcGAL.

Наиболее эффективными ингибиторами TcGAL в ряду алиллбензола оказались эстрагол и эвгенол ($IC_{50} = 20$ и 10 мкМ соответственно). Сравнение IC_{50} аналогов алиллбензола и представителей алиллполиалкоксибензолов позволяет предположить важную роль аллильного фрагмента для ингибирования TcGAL даже при отсутствии метилendioкси-группы.

Определение механизма ингибирования TcGAL апиолом. Поскольку алиллполиалкоксибензолы оказались более эффективными ингибиторами TcGAL по сравнению с ликорином, представляется целесообразным изучение механизма действия данных соединений и сопоставление с таковым для ликорина, для которого нами был установлен смешанный тип ингибирования в отношении гомологичного фермента L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) [5]. Рассчитаны каталитические параметры исследуемых систем при разных концентрациях апиола: константа Михаэлиса $K_M = 0,14$ мМ по D-арабиноно-1,4-лактону, константа ингибирования $K'_I = 0,043$ мМ и значения k_{cat} (приведены на рис. 5). Из полученных данных следует, что при увеличении концентрации ингибитора константа Михаэлиса остаётся неизменной, в то время как значение k_{cat} снижается, что соответствует неконкурентному типу ингибирования.

Таким образом, установлен неконкурентный механизм ингибирования TcGAL апиолом с константой ингибирования $K'_I = 0,043$ мМ (рис. 5), что хорошо соотносится с параметром $IC_{50} = 50$ мкМ (табл. 1).

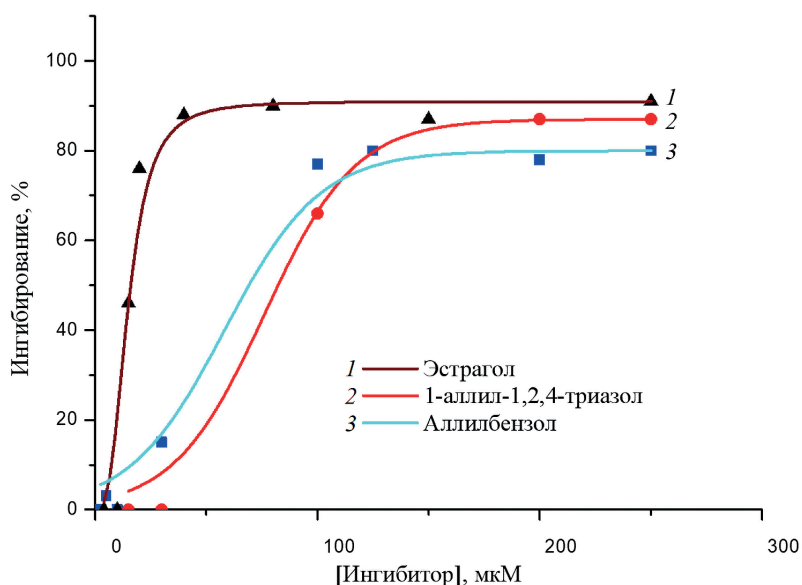


Рис. 4. Сравнение ингибирующих эффектов аллилбензола, 1-аллил-1,2,4-триазола и эстрагола.

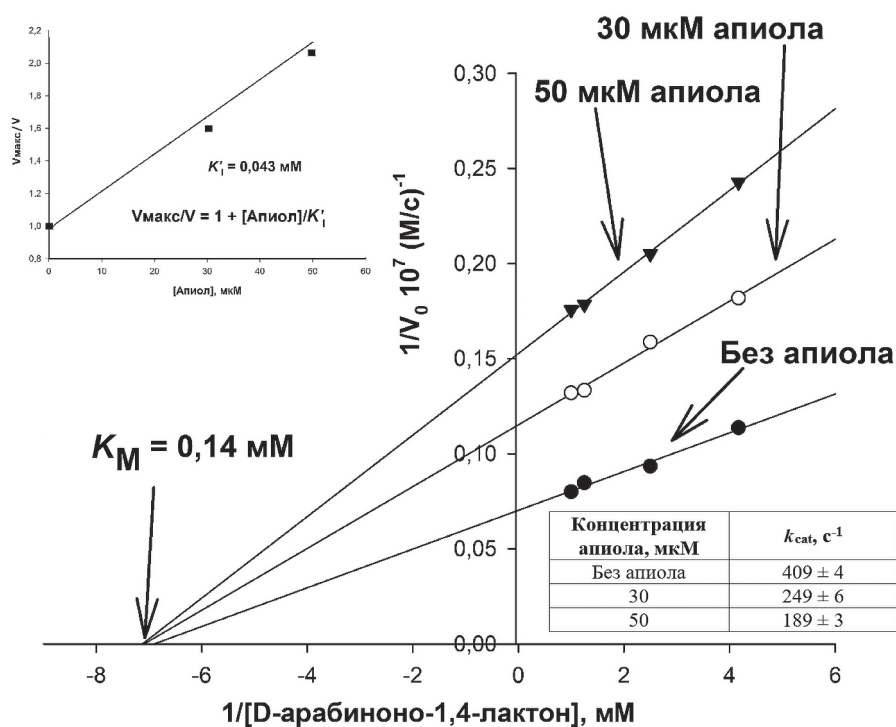


Рис. 5. Определение механизма ингибирования TcGAL апиолом в координатах Лайнуивера–Берка. Концентрации апиола: 0, 30 и 50 мкМ. Концентрации D-арабиноно-1,4-лактона 0,25–1 мМ (T = 25 °C). Параметры имеют максимальную погрешность не более 15%

Влияние халконов на активность TcGAL.

Представляется важным также более детальное изучение роли метилендиокси-группы в ингибировании этого фермента при отсутствии аллильной группы. С этой целью исследовали действие на TcGAL ряда халконов, содержащих метилендиокси-группу как с метоксигруппами, так и без них (см. табл. 1).

Поскольку многие халконы подавляют рост *T. cruzi* в достаточно низкой концентрации (порядка 20 мкМ) [7], мы предположили, что такие соединения в сопоставимой концентрации также будут способны ингибировать TcGAL.

Однако влияние исследованных халконов на TcGAL оказалось довольно слабым — максимальный эффект составил не более 25% в концентрации 500 мкМ для 2,5-диметокси-3,4-метилендиокси-4'-метоксихалкона (табл. 1). Таким образом, можно предположить, что при отсутствии аллильного радикала метилендиокси-группа вносит слабый вклад в ингибирование TcGAL. Отметим, однако, что исследованные халконы отличаются от аллилполиалкоксибензолов «довеском» в виде ещё одного замещённого бензольного кольца, что может мешать взаимодействию с TcGAL. Вероятно, угнетение роста трипаносомы халконами может происходить по другому механизму (мишень неизвестна), не через ингибирование TcGAL.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Впервые найден класс ингибиторов галактонолактонооксидазы TcGAL из *T. cruzi*, которая катализирует финальную стадию синтеза витамина С в трипаносомах и рассматривается как потенциальная мишень для разработки лекарств против трипаносомных инфекций.

Обнаружено, что АПАБ (апиол, диллапиол) и аллилбензолы (эвгенол, эстрагол) эффективно ингибируют TcGAL в диапазоне концентраций 20–50 мкМ. По литературным данным, диллапиол в сопоставимой концентрации 60 мкМ угнетает рост *L. brasiliensis* [10], что может свидетельствовать об ингибировании TcGAL как о ключевом механизме противопаразитарного действия диллапиола в отношении трипаносоматид. Также интересно отметить, что, согласно Morais et al. [14], близкий изомер эвгенола — изоэвгенол — обладает сопоставимым $IC_{50} = 51$ мкМ в отношении самой *T. cruzi*. Таким образом, есть основания предполагать, что TcGAL представляет собой молекулярную мишень, возможно, не единственную, на которую действуют соединения класса АПАБ. Ранее было известно, что ряд соединений данного класса обладают противопаразитарным эффектом, но данные об их механизме действия и клеточной мишени отсутствовали. Полученные данные указывают

на важную роль аллилбензольного фрагмента в ингибировании TcGAL. В то же время метилendioкси-группа, общая для ликорина, АПАБ и ряда халконов, не является необходимой для воздействия на этот фермент.

Интересно, что бензодиоксольный фрагмент является единственным общим структурным компонентом для целого ряда алкалоидов, включая ликорин, проявляющих антитрипаносомную активность с IC_{50} в диапазоне 0,5–200 мкМ, но в основном их противопаразитарное действие наблюдается либо при концентрациях около 60 мкМ, как у кринина, либо при 1 мкМ, как у ликорина [4]. При этом IC_{50} ликорина (450 мкМ) в отношении TcGAL значительно выше. Эти данные указывают на возможное участие бензодиоксольного фрагмента (или метилendioкси-группы) в угнетении роста *T. cruzi*, но конкретная мишень (фермент) не установлена.

Дальнейшая оптимизация обнаруженных в данной работе ингибиторов TcGAL может послужить основой для создания лекарств против болезни Шагаса. Полученные результаты также могут быть использованы для поиска

эффективных способов лечения грибковых инфекций за счёт ингибирования гомологичных ферментов.

Вклад авторов. Е.В. Кудряшова — концепция и руководство работой; В.В. Семенов, С.С. Крылов — обсуждение стратегии исследования серии ингибиторов; А.А. Чудин — проведение экспериментов; Е.В. Кудряшова, А.А. Чудин, В.В. Семенов, С.С. Крылов — обсуждение результатов исследования; А.А. Чудин — написание текста; Е.В. Кудряшова, А.А. Чудин, В.В. Семенов — редактирование текста статьи; И.Д. Злотников — измерения и анализ ИК-спектров.

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования (ИК-спектрометр Фурье Bruker Tensor 27 (Германия) и КД-спектрометр Jasco J-815 (Япония)) по программе развития МГУ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. García-Huertas, P., and Cardona-Castro, N. (2021) Advances in the treatment of Chagas disease: promising new drugs, plants and targets, *Biomed. Pharmacother.*, **142**, 112020, doi: 10.1016/j.biopha.2021.112020.
2. Lepesheva, G. I., Villalta, F., and Waterman, M. R. (2011) Targeting *Trypanosoma cruzi* sterol-14 α -demethylase (CYP51), **75**, 65–87, doi: 10.1016/b978-0-12-385863-4.00004-6.
3. Kudryashova, E. V., Leferink, N. G. H., Slot, I. G. M., and van Berkel, W. J. H. (2011) Galactonolactone oxidoreductase from *Trypanosoma cruzi* employs a FAD cofactor for the synthesis of vitamin C, *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 545–552, doi: 10.1016/j.bbapap.2011.03.001.
4. Martinez-Peinado, N., Cortes-Serra, N., Torras-Claveria, L., Pinazo, M.-J., Gascon, J., Bastida, J., and Alonso-Padilla, J. (2020) Amaryllidaceae alkaloids with anti-*Trypanosoma cruzi* activity, *Parasites Vectors*, **13**, doi: 10.1186/s13071-020-04171-6.
5. Chudin, A. A., and Kudryashova, E. V. (2022) Improved enzymatic assay and inhibition analysis of redox membranotropic enzymes, AtGALDH and TcGAL, using a reversed micellar system, *Analytica*, **3**, 36–53, doi: 10.3390/analytica3010004.
6. Zheoat, A. M., Alenezi, S., Elmahallawy, E. K., Ungogo, M. A., Alghamdi, A. H., Watson, D. G., Igoli, J. O., Gray, A. I., de Koning, H. P., and Ferro, V. A. (2021) Antitrypanosomal and antileishmanial activity of chalcones and flavanones from *Polygonum salicifolium*, *Pathogens*, **10**, 175, doi: 10.3390/pathogens10020175.
7. Aponte, J. C., Verástegui, M., Málaga, E., Zimic, M., Quiliano, M., Vaisberg, A. J., Gilman, R. H., and Hammond, G. B. (2008) Synthesis, cytotoxicity, and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of new chalcones, *J. Med. Chem.*, **51**, 6230–6234, doi: 10.1021/jm800812k.
8. Tsyganov, D. V., Samet, A. V., Silyanova, E. A., Ushkarov, V. I., Varakutin, A. E., Chernysheva, N. B., Chuprov-Netochin, R. N., Khomutov, A. A., Volkova, A. S., Leonov, S. V., Semenova, M. N., and Semenov, V. V. (2022) Synthesis and antiproliferative activity of triphenylphosphonium derivatives of natural allyl-polyalkoxybenzenes, *ACS Omega*, **7**, 3369–3383, doi: 10.1021/acsomega.1c05515.
9. Zlotnikov, I. D., Belogurova, N. G., Krylov, S. S., Semenova, M. N., Semenov, V. V., and Kudryashova, E. V. (2022) Plant alkylbenzenes and terpenoids in the form of cyclodextrin inclusion complexes as antibacterial agents and levofloxacin synergists, *Pharmaceuticals*, **15**, 861, doi: 10.3390/ph15070861.
10. Parise-Filho, R., Pasqualoto, K. F. M., Magri, F. M. M., Ferreira, A. K., da Silva, B. A. V. G., Damião, M. C. F. C. B., Tavares, M. T., Azevedo, R. A., Auada, A. V. V., Polli, M. C., and Brandt, C. A. (2012) Dillapiole as antileishmanial agent: discovery, cytotoxic activity and

- preliminary SAR studies of dillapiol analogues, *Arch. Pharm.*, **345**, 934-944, doi: 10.1002/ardp.201200212.
11. Laubasarova, I. R., Khailova, L. S., Nazarov, P. A., Rokitskaya, T. I., Silachev, D. N., Danilina, T. I., Plotnikov, E. Y., Denisov, S. S., Kirsanov, R. S., Korshunova, G. A., Kotova, E. A., Zorov, D. B., and Antonenko, Y. N. (2020) Linking 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD) to triphenylphosphonium yields mitochondria-targeted protonophore and antibacterial agent, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1578-1590, doi: 10.1134/S000629792012010X.
 12. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартинек К. (1984) Микрогетерогенная среда для химических (ферментативных) реакций на основе коллоидного раствора воды в органическом растворителе, *Усп. Хим.*, **53**, 545-565.
 13. Klyachko, N. L., Shchedrina, V. A., Efimov, A. V., Kazakov, S. V., Gazaryan, I. G., Kristal, B. S., and Brown, A. M. (2005) pH-dependent substrate preference of pig heart lipoamide dehydrogenase varies with oligomeric state: response to mitochondrial matrix acidification, *J. Biol. Chem.*, **280**, 16106-16114, doi: 10.1074/jbc.M414285200.
 14. Morais, T. R., Conserva, G., Varela, M. T., Costa-Silva, T. A., Thevenard, F., Ponci, V., Fortuna, A., Falcão, A. C., Tempone, A. G., Fernandes, J., and Lago, J. (2020) Improving the drug-likeness of inspiring natural products – evaluation of the anti-parasitic activity against *Trypanosoma cruzi* through semi-synthetic and simplified analogues of licar-in A, *Sci. Rep.*, **10**, 5467, doi: 10.1038/s41598-020-62352-w.

INHIBITORS OF GALACTONOLACTONE OXIDASE FROM *Trypanosoma cruzi* BASED ON ALLYLPOLYALKOXYBENZENES

A. A. Chudin¹, I. D. Zlotnikov¹, S.S. Krylov², V. V. Semenov², and E. V. Kudryashova^{1*}

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; E-mail: helenakoudriachova@yandex.ru

² N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

Inhibition of the biosynthetic pathways of compounds essential for *T. cruzi* is considered by researchers as one of the possible mechanisms of action of potential drugs against Chagas disease. As one of these mechanisms, we consider inhibition of galactonolactone oxidase from *T. cruzi* (TcGAL), which catalyzes the final step in the synthesis of vitamin C, an antioxidant that *T. cruzi* is unable to assimilate from outside and must synthesize itself. In this work, for the first time, a class of effective inhibitors of TcGAL was found – allylbenzenes from plant sources. A non-competitive mechanism of action of apiol has been established and it has been found that natural allylpolyalkoxybenzenes (APAB) – apiol, dillapiol, etc. are effective inhibitors of TcGAL with IC₅₀ = 20-130 μM. It was found that the conjugation of APAB with triphenylphosphonium, which ensures the selective delivery of biologically active substances to mitochondria, makes it possible to increase the efficiency and/or the maximum percentage of inhibition compared to unmodified APAB.

Keywords: galactonolactone oxidase, Chagas disease, inhibitors, apiol, allylpolyalkoxybenzenes, triphenylphosphine derivatives, dillapiol, myristicin, eugenol, estragole