

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Чудин Андрей Алексеевич**

Регуляция каталитических свойств галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi*  
в системах обращённых мицелл

1.5.6. Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2024

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета  
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Научный руководитель:** **Кудряшова Елена Вадимовна**  
доктор химических наук, доцент

**Официальные оппоненты:** **Марквичева Елена Арнольдовна**  
доктор химических наук, Институт биоорганической  
химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,  
руководитель лаборатории биомедицинских  
материалов, главный научный сотрудник

**Шумянцева Виктория Васильевна**  
доктор биологических наук, профессор,  
Научно-исследовательский институт биомедицинской  
химии имени В.Н. Ореховича Российской академии  
наук, заведующая лабораторией биоэлектрохимии

**Сыбачин Андрей Владимирович**  
кандидат химических наук,  
Московский государственный университет имени  
М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра  
высокомолекулярных соединений, доцент

Защита диссертационной работы состоится **«10» декабря 2024 года в 15 часов** на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 11Б, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3159>

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук

И.К. Сакодынская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Мембранные ферменты играют важную роль в живых организмах, и изучение их свойств необходимо для детального понимания путей метаболизма, механизмов регуляции и других аспектов жизни. Однако исследование многих мембранных ферментов затруднено ввиду потери их каталитических свойств в водных растворах, что обуславливает необходимость применения мембраноподобных систем. В качестве таких систем часто используют обращённые мицеллы поверхностно-активных веществ (ПАВ).

Обращённые мицеллы представляют ценный инструмент для исследования мембранных ферментов и анализа влияния олигомерного состава на каталитические характеристики ферментов. В литературе описано функционирование в мицеллярных системах ряда мембранных ферментов, например кислой фосфатазы и липоамиддегидрогеназы, однако механизмы влияния эффекторов (электроноакцепторов, активаторов и ингибиторов) на активность подобных ферментов требуют дальнейшего изучения.

Важным практическим направлением, связанным с мембранными ферментами, является поиск лекарственных мишеней-ферментов и разработка соответствующих лекарств. В настоящее время активно ведутся поиски лекарств против таких болезней как туберкулёз (молекулярная мишень – липоамиддегидрогеназа) и малярия (дигидрооротатдегидрогеназа).

Галактонолактонооксидаза из одноклеточного паразита *Trypanosoma cruzi* (TcGAL, EC 1.3.3.12), вызывающего болезнь Шагаса – мембранный фермент класса ванилилалкогольдегидрогеназ (VAO), катализирующий финальную стадию синтеза витамина С в *T. cruzi* – антиоксиданта, играющего важную роль для жизнеспособности *T. cruzi*, защищая её от воздействия активных форм кислорода в ходе проникновения в макрофаги хозяина. Поэтому TcGAL является перспективной лекарственной мишенью для лечения трипаносомной инфекции, вызывающей болезнь Шагаса. В настоящее время болезнью Шагаса страдают 7-8 млн человек, ещё 80 млн живут в зонах риска. Для лечения существует лишь два препарата (бензнидазол и нифуртимокс), которые недостаточно эффективны и обладают серьёзным побочным действием. В силу отсутствия галактонолактонооксидазы в организме человека соответствующий ингибитор может рассматриваться как потенциально селективное лекарство против трипаносомной инфекции. TcGAL (молекулярная масса 56,7 кДа) содержит кофактор флавинадениндинуклеотид (FAD). Каталитический цикл FAD-зависимого TcGAL включает в себя две полу-реакции: восстановительную и окислительную, где в качестве электроноакцептора (ЭА) могут выступать как кислород (оксидазная активность), так и другие соединения (дегидрогеназная активность). TcGAL – оксидаза, которая проявляет также дегидрогеназную активность.

Фермент TcGAL не удастся получить методами генной инженерии в активной и растворимой форме – он образуется в неактивной и нерастворимой форме в виде «телец включения». В нашей лаборатории показано, что получить фермент в активной форме удастся, проводя его рефолдинг в системе обращенных мицелл. Исследование TcGAL осложняется тем, что не разработан эффективный метод определения его активности в мицеллярной системе. Для отработки методик исследования каталитических характеристик TcGAL мы использовали гомологичный фермент растительного происхождения L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназу из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) (E.C. 1.3.2.3). AtGALDH получается в активной форме после экспрессии в *E. coli*. AtGALDH активен как в водном растворе, так и в мицеллярной системе. AtGALDH – митохондриальный флавофермент из VAO-семейства, имеет близкую к TcGAL молекулярную

массу 58,8 кДа и катализирует ту же реакцию синтеза аскорбиновой кислоты в растениях из L-галактоно-1,4-лактона с использованием цитохрома C.

Однако, в отличие от TcGAL, AtGALDH практически не обладает оксидазной активностью (константа скорости реакции с молекулярным кислородом составляет  $6 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ). Наличие оксидазной активности у ферментов из VAO-семейства, то есть способность использовать в качестве ЭА кислород, может определяться наличием или отсутствием “привратника”, регулирующего доступ  $\text{O}_2$  к кофактору флавины. В качестве “привратника” в случае дегидрогеназ VAO-семейства выступает остаток Ala113. Мутация A113G в AtGALDH создает пространство для молекулярного кислорода, который может достигать и взаимодействовать с локусом N5-C4a восстановленного кофактора FAD. Так, мутантная форма AtGALDH (A113G), в отличие от дикой, проявляет оксидазную активность, как и TcGAL, но при этом функционирует как в мицеллярной, так и в водной средах. AtGALDH и AtGALDH (A113G) в данной работе использовали как модельные ферменты для изучения влияния эффекторов и среды на дегидрогеназную и оксидазную активности.

Таким образом, исследование и регуляция каталитических свойств AtGALDH и TcGAL, с одной стороны, углубляет знания о таких аспектах функционирования мембранных ферментов как влияние эффекторов на каталитическую активность и её зависимость от состава биомембран (мицеллярной матрицы), и, с другой стороны, позволяет вести целенаправленный поиск ингибиторов TcGAL (потенциальных лекарств против болезни Шагаса).

**Степень разработанности темы.** Методика определения активности AtGALDH в водной среде основана на спектрофотометрическом определении изменения концентрации цитохрома C или искусственного ЭА (1,4-бензохинона) в ходе реакции. Однако, при работе в обращенных мицеллах цитохром C денатурирует, а при использовании 1,4-бензохинона высока скорость побочных процессов. Ранее в нашей лаборатории была разработана методика рефолдинга TcGAL в обращенных мицеллах и определения активности TcGAL и AtGALDH с использованием 1,4-бензохинона в качестве ЭА. Определены pH-оптимумы TcGAL и AtGALDH. Ингибирование TcGAL и AtGALDH изучалось для ограниченного круга соединений, которые априори токсичны или не селективны (ионы тяжелых металлов и тиол-модифицирующие агенты). Кроме того, данные по влиянию других эффекторов (активаторов, а также компонентов биомембраны, включая фосфолипиды) и ЭА на активность TcGAL и AtGALDH в литературе не встречаются. Кристаллическая структура AtGALDH, как и TcGAL, в настоящее время не установлена, но имеется теоретическая 3D-модель в базе данных «AlphaFold Protein Structure Database».

**Цель исследования.** Целью исследования является установление механизмов функционирования галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) в мембраноподобных системах и факторов, влияющих на активность данного фермента в сравнении с гомологичным ферментом, функционирующим в водной среде, L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназой из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH). Разработка подхода для проведения ингибиторного анализа позволит проводить поиск эффективных ингибиторов TcGAL для создания потенциального лекарства против болезни Шагаса.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработка надежной и эффективной методики определения активности TcGAL в мицеллярной системе, включая поиск наиболее эффективного электроноакцептора, устойчивого в мицеллярной системе и обеспечивающего высокую скорость ферментативной реакции, высокую чувствительность регистрации

сигнала. Сравнительное исследование функционирования в мицеллярной и в водно-буферной системе модельного фермента, AtGALDH, катализирующего ту же реакцию, что и TcGAL, но способного функционировать в водном растворе для исключения эффекта специфического влияния мицелл.

2. Определение влияния состава мицеллярной матрицы (фосфолипидные добавки, природа и структура мицеллообразующего ПАВ) на функционирование TcGAL в сравнении с AtGALDH.

3. Исследование влияния потенциальных эффекторов: флавоноидов и производных 1,4-бензохинона на активность TcGAL и AtGALDH.

4. Разработка подхода для проведения ингибиторного анализа. Поиск эффективных ингибиторов TcGAL и AtGALDH, определение параметров ингибиторов, установление корреляции между структурой ингибиторов и их эффективностью; установление механизма действия ингибиторов TcGAL и AtGALDH.

5. Исследования влияния трифенилфосфониевого заместителя, обеспечивающего селективную доставку биологически активных веществ в митохондрии (за счёт отрицательного трансмембранного потенциала), на эффективность ингибирования TcGAL соединениями класса аллилполиалкоксибензолов.

6. Выявление молекулярных деталей действия ингибиторов, включая изучение степени влияния ингибиторов в отношении оксидазной и дегидрогеназной активностей TcGAL с использованием в качестве контрольных ферментов дегидрогеназу AtGALDH и её мутантную форму (Ala113Gly), которая, как и TcGAL, проявляет как дегидрогеназную, так и оксидазную активность.

**Научная новизна.** Предложена новая методика определения активности TcGAL и AtGALDH в воде и в мицеллах (АОТ в н-октане), основанная на спектрофотометрическом методе с использованием сочетания феназинметосульфата (электроноакцептор) и 2,6-дихлорфенолиндофенола (проявитель аскорбата – продукта реакции). Разработанная методика обладает существенными преимуществами по сравнению с описанными ранее на основе 1,4-бензохинона: высокой чувствительностью регистрации сигнала, отсутствием фона.

Охарактеризовано действие компонентов природных мембран – фосфолипидов (ФЛ) на активность TcGAL и AtGALDH: показано, что 5 % добавки фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (% w/w) драматически меняют каталитический профиль обоих ферментов. Определены условия (степени гидратации мицелл), где наблюдается усиление активности ферментов. Полученный эффект может быть объяснён снижением плотности отрицательного заряда на границе раздела фаз за счёт положительного заряда амино-групп фосфолипидов, а также влиянием фосфолипидных добавок на структуру и жесткость мицелл. Кроме того, согласно данным ИК-спектроскопии и поляризации флуоресценции возрастание активности ферментов связано с образованием белок-липидных комплексов.

Изучено действие природных ЭА дыхательной цепи в отношении TcGAL и AtGALDH: показано, что коэнзимы Q<sub>1</sub> и Q<sub>0</sub> могут выступать в качестве ЭА для обоих ферментов, в то время как Q<sub>10</sub> является слабым ингибитором AtGALDH. Обнаружено, что структурный аналог коэнзимов, 2,6-диметокси-бензохинон, является наиболее эффективным ЭА для TcGAL и может использоваться для измерения активности TcGAL в отсутствие вспомогательных компонентов (красителя). Установлено, что среди производных 1,4-бензохинона и коэнзимов Q наиболее эффективными являются соединения, несущие метокси-группы (коэнзим Q<sub>0</sub> и 2,6-диметокси-бензохинон).

Впервые найден и исследован ряд эффективных ингибиторов TcGAL и AtGALDH: ликорин и соединения класса терпеноидов (аллилполиалкоксибензолы, АПАБ). Значения IC<sub>50</sub> для АПАБ лежат в

диапазоне 10-100 мкМ, при этом эффективность этих соединений возрастает при использовании их комплексов с метил-циклодекстрином, повышающим растворимость соединений. Идентифицированы структурные фрагменты (метилендиокси-группа и аллильный радикал), общие для ликорина и АПАБ, которые важны для проявления ингибирующего эффекта. Установлено, что АПАБ оказывают более сильный ингибирующий эффект в отношении оксидазной активности по сравнению с дегидрогеназой. Установлены механизмы ингибирования ферментов исследуемыми ингибиторами: ликорин действует преимущественно по конкурентному механизму, а апиол является неконкурентным ингибитором TcGAL.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Всестороннее изучение свойств гомологичных ферментов TcGAL и AtGALDH (влияние ЭА, ингибиторов, компонентов природной мембраны) способствует более детальному пониманию функционирования мембранных ферментов и открывает новые пути к регуляции их каталитических свойств.

Практическая значимость исследования состоит в открытии нового класса ингибиторов фермента TcGAL, являющихся потенциальными лекарствами. Идентификация структурных фрагментов, ответственных за ингибирование TcGAL, позволяет вести целенаправленный поиск новых ингибиторов TcGAL, являющегося потенциальной мишенью для лекарств против болезни Шагаса. Изучение влияния различных эффекторов на активность TcGAL также способствует лучшему пониманию функционирования фермента в микроорганизме. Кроме того, полученные результаты расширяют возможности по поиску лекарственной основы против других болезней, поскольку гомологичные дегидрогеназы рассматриваются как терапевтические мишени для лечения ряда других схожих заболеваний (грибковых, бактериальных, а также вызываемых паразитическими микроорганизмами, например, малярии).

**Методология и методы исследования.** Для получения каталитически активной формы TcGAL проводили рефолдинг фермента в системе обращённых мицелл АОТ. Измерение активности TcGAL и AtGALDH проводили в системе обращённых мицелл АОТ с использованием комбинации электроноакцептора (феназинметосульфата) и красителя (2,6-дихлорфенолиндофенола). Для изучения влияния липидных компонентов и эффекторов на активность TcGAL и AtGALDH применены методы УФ-видимой спектрофотометрии, ИК-спектроскопии, флуоресцентной спектроскопии и поляризации флуоресценции. Для исследования влияния природы ПАВ на размер образующихся мицелл и для установления олигомерного состава ферментов использовали методы динамического светорассеивания и седиментационного анализа. Для оценки целесообразности применения AtGALDH в качестве модельного фермента по отношению к TcGAL использовали методы биоинформатики (поиск последовательностей ферментов по базам данных и построение множественных выравниваний).

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Разработанная методика измерения активности AtGALDH и TcGAL с использованием обращённых мицелл АОТ характеризуется высокой чувствительностью регистрации сигнала и отсутствием фона.

2. Природа мицеллообразующего ПАВ влияет на олигомерный состав AtGALDH и TcGAL: в мицеллах на основе анионного АОТ наблюдается функционирование как мономерной, так и димерной форм фермента; в присутствии катионного ЦТАБ и нейтрального Бридж-96 ферменты функционируют в мономерной форме. Содержание фосфолипидов в составе мицеллярной матрицы значительно влияет на

каталитические профили AtGALDH и TcGAL за счет изменения заряда поверхности раздела фаз и образования белок-липидных комплексов.

3. Коэнзимы Q<sub>0</sub>, Q<sub>1</sub>, 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинон и 2,6-диметокси-1,4-бензохинон являются электроноакцепторами TcGAL и AtGALDH. Флавоноиды (кверцетин и дигидрокверцетин) являются активаторами TcGAL.

4. Соединения ряда аллилполиалкоксибензолов (АПАБ) и ряда аллилбензола являются ингибиторами TcGAL с IC<sub>50</sub> = 10-100 мкМ. Аллильная и метокси- группы в соединениях ряда АПАБ отвечают за усиление ингибирующего эффекта. TcGAL и AtGALDH ингибируются апиолом и ликорином по неконкурентному и конкурентному механизму ингибирования соответственно.

5. Конъюгирование АПАБ с трифенилфосфониевым фрагментом приводит к усилению их ингибиторной способности по сравнению с немодифицированными АПАБ.

6. АПАБ оказывают больший эффект в отношении оксидазной составляющей TcGAL по сравнению с дегидрогеназной, что обуславливает неполное ингибирование TcGAL соединениями АПАБ.

**Личный вклад автора.** Представленные в работе данные получены лично автором или при непосредственном участии автора на всех этапах комплексного исследования под руководством д.х.н. Кудряшовой Е.В. Автор самостоятельно изучил литературные данные и составил литературный обзор. Автор самостоятельно или при непосредственном участии выполнил все эксперименты, самостоятельно обработал и проанализировал полученные результаты. Автором проведена значительная работа над текстом статей и их представлением. Автор участвовал в переписке с редакторами и рецензентами. В работах, опубликованных в соавторстве, определяющий вклад принадлежит автору. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя была определяющей.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Основные результаты диссертационной работы были представлены автором на российских и международных конференциях, в том числе Всероссийской конференции «Поверхностные явления в дисперсных системах» (2023, Москва, Россия), 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (2023, Суздаль, Россия), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (2022, 2023, 2024, Москва, Россия), Международном конгрессе «Биотехнология: Состояние и перспективы развития» (2021, 2022, Москва, Россия), IX Международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков (2022, Новосибирск, Россия), 13-ой Международной конференции «Bionanotox» (2022, Греция), XXVIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины - 2022» (2022, Санкт-Петербург, Россия), Международного конгресса молодых ученых в фармации «Drug research» (2021, Казань, Россия), Всероссийской конференции «Липиды 2021» (2021, Москва, Россия).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 8 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibraryScience Index", и 12 тезисов докладов всероссийских и международных конференций.

**Структура и объем.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка

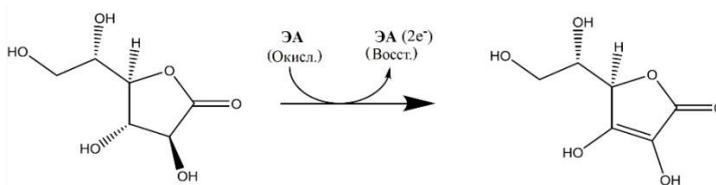
литературы, включающего 159 ссылок. Работа изложена на 132 страницах, содержит 28 таблиц и 58 рисунков.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В настоящей работе исследованы свойства галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* и влияние эффекторов (ингибиторов, электроноакцепторов, активаторов) на активность данных ферментов. В качестве ингибиторов ферментов изучали аллилполиалкоксибензолы, халконы, производные аллилбензола и ликорин, обладающие анти-трипанасомным эффектом. Исследуемыми ЭА TcGAL и AtGALDH являлись: коэнзимы Q и производные 1,4-бензохинона. В качестве активаторов ферментов изучены флавоноиды: кверцетин и дигидрокверцетин. В роли компонентов мембраны *T. cruzi*, которые могут влиять на активность TcGAL и AtGALDH, изучены фосфолипиды фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭ).

**Разработка подхода к измерению активности и ингибиторного анализа TcGAL и AtGALDH с использованием системы обращённых мицелл.** Фермент TcGAL не удастся получить методами генной инженерии растворимой форме – он образуется в виде «телец включения». Получить фермент в активной форме можно, если провести его рефолдинг в системе обращенных мицелл, являющихся модельными системами митохондриальных мембран (мембраны митохондрий часто содержат небислойные липидные структуры, представляющие собой ассоциаты молекул липидов, построенные по типу обращённых мицелл). Однако выделить фермент из мицеллярной системы в водную фазу не удастся, поскольку это мембрано-зависимый фермент и в водной среде не поддерживает нативную конформацию.

Поиск ингибиторов для TcGAL осложняется тем, что не разработан эффективный метод определения его активности в обращенных мицеллах. В данной работе в качестве контрольного фермента использовали гомологичный фермент растительного происхождения из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH), катализирующий ту же реакцию, в ходе которой происходит окисление субстрата, при этом восстанавливаются либо две молекулы одноэлектронного акцептора (ЭА) (цитохром C), либо одна молекула двухэлектронного (1,4-бензохинон) (рис. 1).



**Рисунок 1.** Реакция окисления ГЛ, катализируемая AtGALDH и TcGAL.

AtGALDH получается в активной и растворимой форме после экспрессии в *E. coli* и обладает сходными с TcGAL параметрами и субстратной специфичностью. При этом AtGALDH, в отличие от TcGAL активен как в мицеллярной системе, так и в водном растворе. Для оценки гомологии TcGAL и AtGALDH мы выполнили множественное выравнивание TcGAL, AtGALDH и двух контрольных ферментов – L-галактон-1,4-лактондегидрогеназ из *Ipomoea batatas* и *Zea mays*, соответственно. Мы обнаружили наличие общих остатков Glu и Arg в активных центрах ферментов (обведены красным на рис. 2) и высокое сходство окружения этих аминокислотных остатков (сходные положения выделены на рис. 2 темным и светло-серым цветом, соответственно). Имеется консервативный остаток Cys (рис. 2), который, как показано в литературе, также играет важную роль в катализе L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназ.

```

AtGALDH 400 -----LALDPLNDVHVAKVNOAEAEFWKKSEGYRVGWSDEILGFDCBGQQWVSESCFP 452
IbGALDH 374 -----LALDPLNTDHSVKKTNQAEAEFWRKSEGYRVGWSDEILGFDCBGHQWVSETCFP 426
ZmGALDH 373 -----LALDPLDKDHVVKINKAEAEYWKKSEGYRMGWSDEILGFDCBGQQWVSENCFP 425
TcGAL 305 HGVVQAALAAATFYPMQPYINRAAYRKIFYSASEVOYGTPIECFTFLCLFKQWACEWAVD 364

AtGALDH 453 AGTLANPSMKDLEYTEELKKLTEKEAIPAPAFIEQRWTARSKSPISPAFSTSEDDIFSWV 512
IbGALDH 427 AGTLSKPSMKDLEFIEQLMQLTEKESIPAPAFIEQRWTACSKSLMSPAYSSVDDDI FSWV 486
ZmGALDH 426 TGT LAKPSMKDLDYIDKLLQLTEKEEIPAPGFIQRWTARSKSPMSPASSSEDDVFSWV 485
TcGAL 365 A-----SKATEAFALLREMTASENFSVHFVEVEFRFTDADKTALSPAHG----RKTCTI 413

```

**Рисунок 2.** Выравнивание множественных последовательностей AtGALDH, TcGAL и L-галактон-1,4-лактондегидрогеназ из *Ipomoea batatas* (IbGALDH) и *Zea mays* (ZmGALDH) в программе Clustal Omega.

Согласно данным, полученным в нашей лаборатории, вторичная структура, определённая методом КД-спектроскопии, практически идентична для TcGAL и AtGALDH. Кристаллические 3D-структуры TcGAL и AtGALDH отсутствуют, однако сравнение теоретических структур TcGAL и AtGALDH, в базе данных AlphaFold, показывает их значительное сходство (RMSD = 1,239). Наличие общих аминокислотных остатков в активных центрах, высокое сходство 3D- и вторичных структур говорит о правомерности использования AtGALDH как модельного фермента по отношению к TcGAL.

Методики определения активности TcGAL и AtGALDH в водном растворе, описанные в литературе, основаны на спектрофотометрическом определении изменения концентрации ЭА – цитохрома-С или 1,4-бензохинона (БХ) в ходе реакции. Однако, в обращенных мицеллах цитохром С теряет свойства ЭА, а при использовании искусственного акцептора БХ высока скорость побочных процессов, что снижает надёжность регистрации сигнала. Требуется найти подходящий ЭА, с которым будет возможна чувствительная регистрация ферментативной реакции в обращенных мицеллах.

С целью разработки эффективного подхода к измерению активностей TcGAL и AtGALDH изучали влияние структуры ЭА на активность ферментов и сравнивали разностные коэффициенты молярного поглощения окисленной и восстановленной форм ЭА (табл. 1).

**Таблица 1.** Параметры изучаемых ЭА в водных и мицеллярных средах. [AtGALDH] = 6 нМ, [ГЛ] = 1 мМ.

ЭА	Среда*	$K_M$ (ЭА), мМ	$K_M$ (субстрат), мМ	$V_{\max}$ , мкМ/с	$V_{\max}/V_{\text{фон}}$	$\epsilon_{\text{окисл-восст}} \cdot 10^3$ , $M^{-1}cm^{-1} (\lambda, \text{нм})$
Цитохром С	Вода	$0,071 \pm 0,002$	$0,17 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,1$	460	21 (550)
1,4-бензохинон	Вода	$0,57 \pm 0,04$	$0,19 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,04$	7	2,3 (290)
	Мицеллы	$0,40 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,03$	$0,52 \pm 0,07$	6	2,3 (290)
Тетраметилфенилендиамин	Вода	$1,0 \pm 0,1$	$0,20 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,03$	2,7	8,4 (590)
	Мицеллы	$2,7 \pm 0,2$	$0,27 \pm 0,03$	$2,6 \pm 0,3$	13	7,8 (605)
ФМС	Вода	$0,022 \pm 0,003$	$0,21 \pm 0,02$	$1,3 \pm 0,1$	6	25 (388)
	Мицеллы	$0,034 \pm 0,002$	$0,23 \pm 0,01$	$1,5 \pm 0,2$	10,7	25 (388)
ФМС + 2,6-ДХФИФ	Мицеллы	$0,028 \pm 0,001$	$0,21 \pm 0,02$	$1,2 \pm 0,1$	160	11,9 (550)

При сопоставимых значениях  $K_M$  (для основного субстрата и для ЭА) и  $V_{\max}$  предпочтение следует отдать ЭА, обладающему наибольшей разницей молярных коэффициентов поглощения окисленной и восстановленной форм и максимальным соотношением скоростей основной и фоновой реакций ( $V_{\max}/V_{\text{фон}}$ ). Данному критерию наилучшим образом удовлетворяет комбинация феназинметосульфата (ФМС) и красителя 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) (табл. 1). На основании полученных данных были

выбраны следующие условия для измерения каталитической активности AtGALDH: ФМС (120 мкМ) в качестве ЭА в сочетании с 120 мкМ красителем ДХФИФ (длина волны 550 нм в мицеллярной среде и 600 нм в водной среде), концентрация L-галактоно-1,4-лактона (ГЛ) 1 мМ при изучении ингибирования. Учитывая гомологичность TcGAL и AtGALDH, этот подход был применен далее для измерения активности TcGAL и, соответственно, изучения влияния эффекторов и состава мицеллярной матрицы на активность ферментов.

**Активность TcGAL и AtGALDH в системе обращённых мицелл и влияние состава липидной матрицы на активности ферментов.** Зависимости каталитической активности ферментов в системах обращённых мицелл, как правило, имеют колоколообразный вид, где максимальная активности наблюдается при соответствии размера мицелл и белковой глобулы. Используя разработанный подход к измерению активности TcGAL и AtGALDH, мы обнаружили для обоих ферментов в мицеллах АОТ два оптимума активности ( $W_0 = 21-22$ ) и ( $W_0 = 26-28$ ), которые, предположительно, соответствуют функционированию мономерной и димерной форм ферментов. С применением метода седиментационного анализа мы установили, что AtGALDH в системе обращённых мицелл АОТ функционирует в виде мономера и димера (табл. 2).

**Таблица 2.** Параметры AtGALDH-содержащих мицелл, рассчитанные по данным седиментационного анализа, где  $W_0$  – степень гидратации ( $[H_2O]/[AOT]$ ),  $s_p$  – коэффициент седиментации фермент-содержащих мицелл,  $M_{теор}$  и  $M_p$  – рассчитанная теоретически (исходя из аминокислотной последовательности фермента) и экспериментально (на основании седиментационного анализа) молекулярные массы AtGALDH.

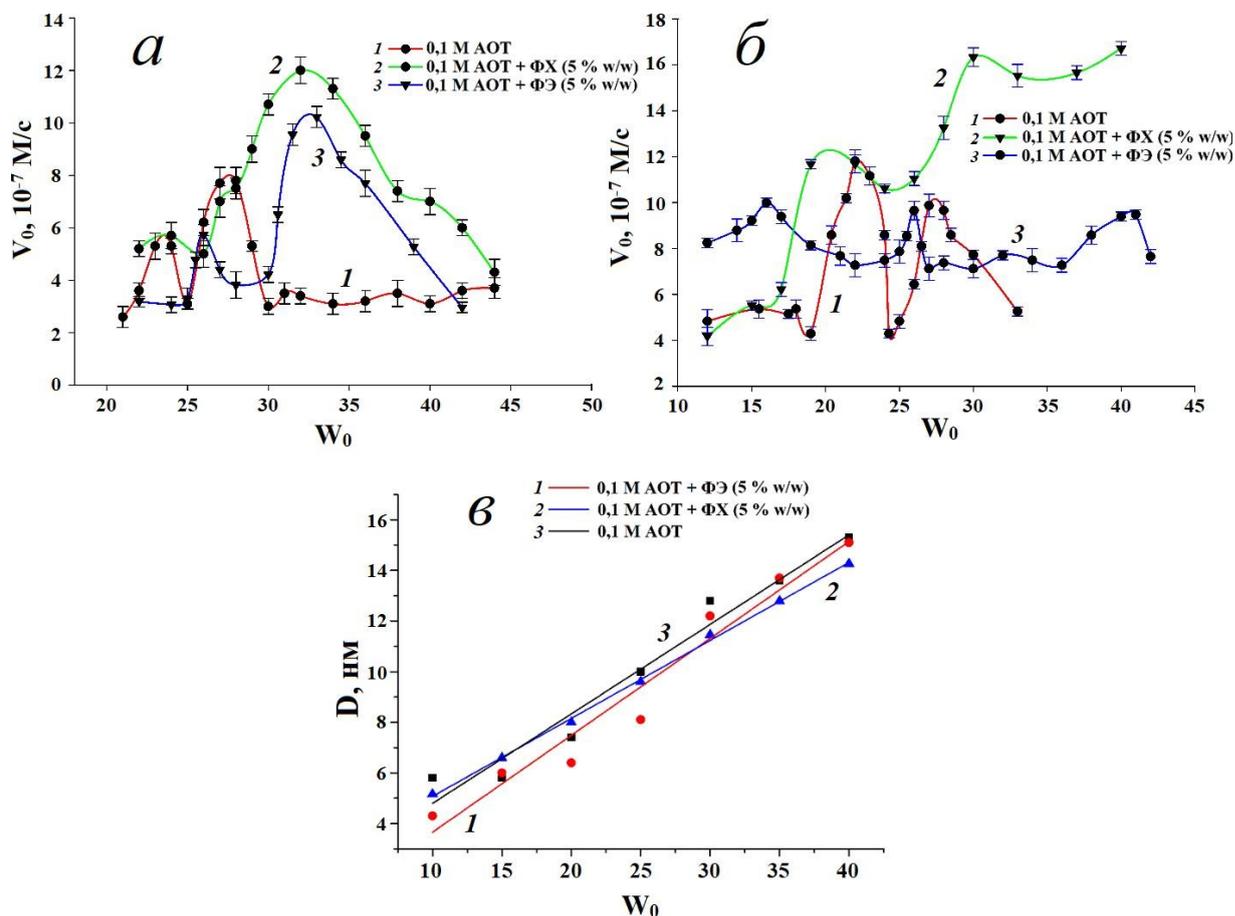
$W_0$	$s_p$	$M_p$ , кДа	$M_{теор}$ , кДа
21	$29 \pm 1$	$66 \pm 5$	59
28	$46 \pm 2$	$111 \pm 9$	118

Определённая экспериментально молекулярная масса фермента  $M_p$  при  $W_0 = 28$  примерно в 2 раза превышает рассчитанное значение  $M_p$  при  $W_0 = 21$  (табл. 2). Таким образом показано, что в мицеллярной системе AtGALDH может существовать в двух различных олигомерных формах (при  $W_0 = 21-22$  – мономер, при  $W_0 > 27-28$  – димер). Принимая во внимание гомологичность AtGALDH и TcGAL и наличие оптимумов активности при тех же степенях гидратации ( $W_0 = 21-22$  и  $W_0 = 26-28$ ), можно заключить, что TcGAL – как и AtGALDH – функционирует в мицеллах в виде мономера и димера. При этом согласно литературным данным в водной среде AtGALDH функционирует только в мономерной форме. Полученные результаты означают, что в мицеллярной системе стабилизируется димерная форма.

Следует учесть, что природные мембраны состоят из ряда компонентов, способных влиять на активность ферментов. Основными липидными компонентами биомембран *T. cruzi* являются фосфолипиды фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭ). ФХ характеризуется относительно объёмной полярной «головной» группой и склонен к образованию ламеллярных структур. В то же время ФЭ склонен образовывать обращённо-фазовые структуры – обращённые мицеллы. При этом степень кривизны в случае ФЭ меньше чем в мицеллах АОТ, поскольку у молекул АОТ более широкая гидрофобная часть. Помимо геометрии молекул, ФХ и ФЭ различаются также по степени «выраженности» заряда аминогруппы: ФХ несёт положительный заряд холиновой группы (экранирована метильными группами), аминогруппа ФЭ имеет  $pK_a = 9,6$  и при слабощелочных рН 8,8 также положительно заряжена.

Установлено, что добавление 5 % (по массе) ФХ или ФЭ существенно меняет профили каталитической активности как TcGAL, так и AtGALDH (рис. 3). Добавление ФХ приводит к увеличению активности обоих ферментов и к размытию пика при высоких степенях гидратации ( $W_0 > 30$ ).

В то же время добавление ФЭ по-разному влияет на TcGAL и AtGALDH. В случае AtGALDH добавление ФЭ приводит к аналогичному размытию пика в области  $W_0 = 30-35$ , как и в случае добавления ФХ к TcGAL. В случае TcGAL при добавлении ФЭ наблюдается дополнительный оптимум активности при  $W_0 = 40$ .



**Рисунок 3.** Профили активности AtGALDH (а) и TcGAL (б) в 0,1 М АОТ в н-октане в отсутствии липидов, при 5 % ФХ и при 5 % ФЭ. 120 мкМ ФМС, 120 мкМ ДХФИФ, 6 нМ AtGALDH, 1 мМ ГЛ (а) 34 нМ TcGAL и 1 мМ АЛ (б),  $\lambda = 550 \text{ нм}$ , 25 °С; (в) - зависимости диаметра мицелл от  $W_0$  по данным ДРС. Мицеллы АОТ с ФЭ или ФХ (5% w/w) и мицеллы АОТ (1), (2) и (3).

Наблюдаемое возрастание активности AtGALDH и TcGAL в присутствии ФХ может быть связано со снижением плотности отрицательного заряда АОТ на поверхности раздела фаз. Включение ФХ в мицеллярную систему может способствовать лучшему взаимодействию фермента с поверхностью раздела фаз (меньше степень отталкивания фермента от отрицательной поверхности раздела фаз, образованной АОТ, и высокое сродство фермента с мембранным фосфолипидом). Кроме того, заряд мицеллярной матрицы может влиять на стабилизацию той или иной формы кофактора в активном центре. Так, положительный заряд в области вблизи локуса N1-C2 изоаллоксазинового кольца флавина у AtGALDH может стабилизировать анионную форму двухэлектронного восстановленного флавина.

Ранее было показано, что включение ФХ и ФЭ, несущих заряженные аминокислоты, в мицеллярную систему может играть существенную роль при взаимодействии мембранотропных ферментов с

мицеллярной матрицей: например, в случае кислой фосфатазы добавление фосфолипидов, склонных снижать плотность отрицательного заряда и тем самым повышать локальный рН вблизи поверхности раздела фаз, снижает активность фермента.

Помимо влияния заряда следует учитывать и возможное изменение размеров мицелл АОТ в присутствии ФХ или ФЭ. Например, в литературе отмечается, что 10%-ная добавка ФХ уменьшает радиус мицелл АОТ (примерно в 1,5 раза). Однако в нашем случае диаметры мицелл АОТ в присутствии 5% ФХ или 5% ФЭ (определённые методом динамического рассеивания света) не изменены по отношению к исходной системе АОТ (рис. 3, (в)) и можно считать несущественным фактором в плане влияния на активность AtGALDH и TcGAL.

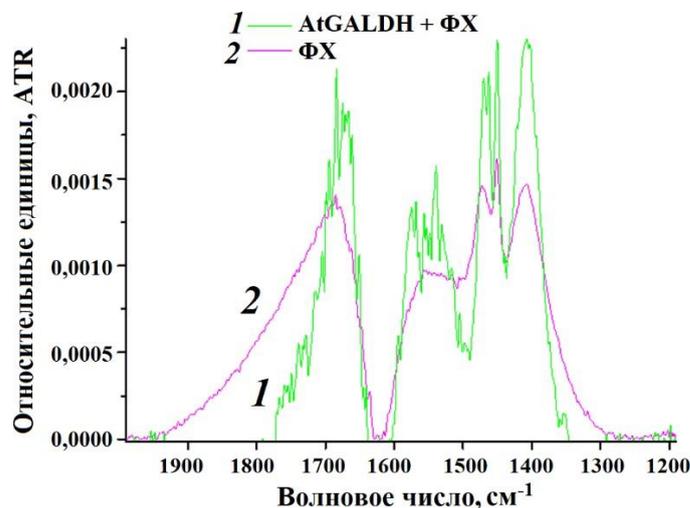
Другим возможным фактором усиления активности ферментов при  $W_0 > 30$  может быть образование тетрамерной формы AtGALDH и TcGAL. На основании анализа ряда ферментов в литературе приводится корреляция между молекулярной массой фермента  $M_6$  и оптимальной степенью гидратации  $W_{0, \text{опт}}$  в мицеллах АОТ, описываемая эмпирическим уравнением:

$$W_{0, \text{опт}} = 0,5^3 \sqrt{M_6} - 2,7$$

Исходя из этого уравнения, ожидаемая степень гидратации  $W_0$  для предполагаемого тетрамера AtGALDH с  $M_p = 264$  кДа составляет 30 и более (30–34 – наблюдается экспериментально в нашем случае).

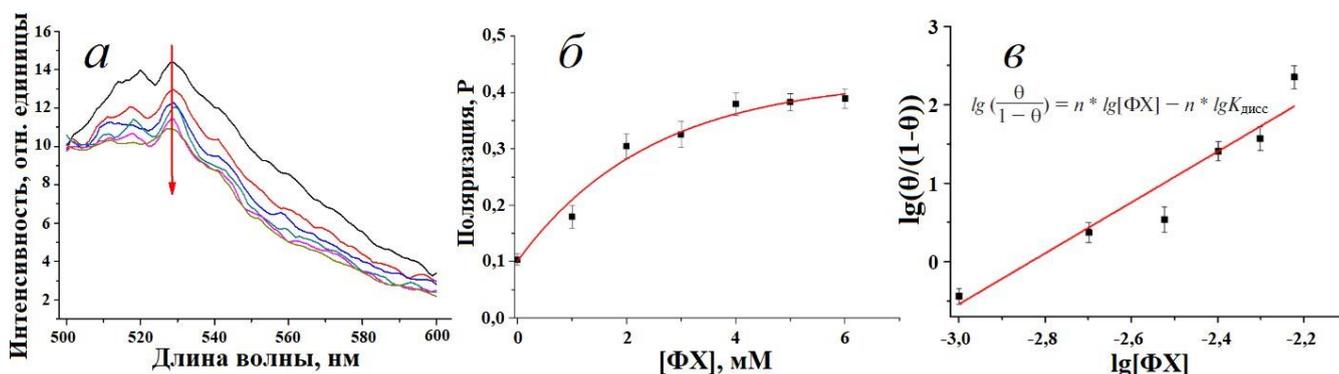
С другой стороны, можно предположить, что оптимум активности AtGALDH при  $W_0 = 30-34$  может быть обусловлен образованием липопротеидных комплексов различного состава, которые были обнаружены и для других мембранотропных ферментов (в т.ч. для кислой фосфатазы). В пользу этого предположения говорит сильная размытость пика при  $W_0 = 30-34$ , в то время как для тетрамерной формы было бы характерно наличие более узкого оптимума, как, например, для тетрамеров лактатдегидрогеназы и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы. Данные, полученные методом ИК-спектроскопии, свидетельствуют об образовании комплекса AtGALDH с ФХ (рис. 4). В ИК спектрах ФХ в присутствии AtGALDH наблюдаются существенные изменения в области карбонильной группы при  $1680 \text{ см}^{-1}$  и при  $1550 \text{ см}^{-1}$  (двойные связи остатков жирных кислот, рис. 4). Эти различия обусловлены тем, что C=O и CH<sub>2</sub>-группы жирнокислотных остатков в ФХ меняют своё микроокружение в присутствии фермента, что указывает на связывание фермента на поверхности раздела фаз липид (ФХ)-вода.

Образование комплекса между AtGALDH и ФХ подтверждается также данными по тушению флуоресценции фермента (по FAD-кофактору), а также увеличению поляризации AtGALDH при возрастании концентрации ФХ (рис. 5, (а) и (б)). Определённый из графиков на рис. 5 параметр  $K_{\text{дисс}}$  – оценивается как 2 мМ. Таким образом, появление оптимумов при  $W_0 > 30$  профилях каталитической активности AtGALDH и TcGAL в случае добавления катионных фосфолипидов наиболее вероятно обусловлено формированием фермент-липидных комплексов.



**Рисунок 4.** Сравнение спектра смеси AtGALDH (70 мкМ) и FX (4 мМ) за вычетом фонового спектра AtGALDH (кривая 1) со спектром раствора FX (4 мМ, кривая 2).

Отметим, что вышеописанное влияние липидов на активность AtGALDH и TcGAL проводилось в мицеллах на основе анионного ПАВ (АОТ). Однако литературные данные свидетельствуют о значительной роли природы (заряда, структуры) самого мицеллообразующего ПАВ на каталитическую активность многих мембранных ферментов, что было изучено нами далее в отношении AtGALDH и TcGAL.



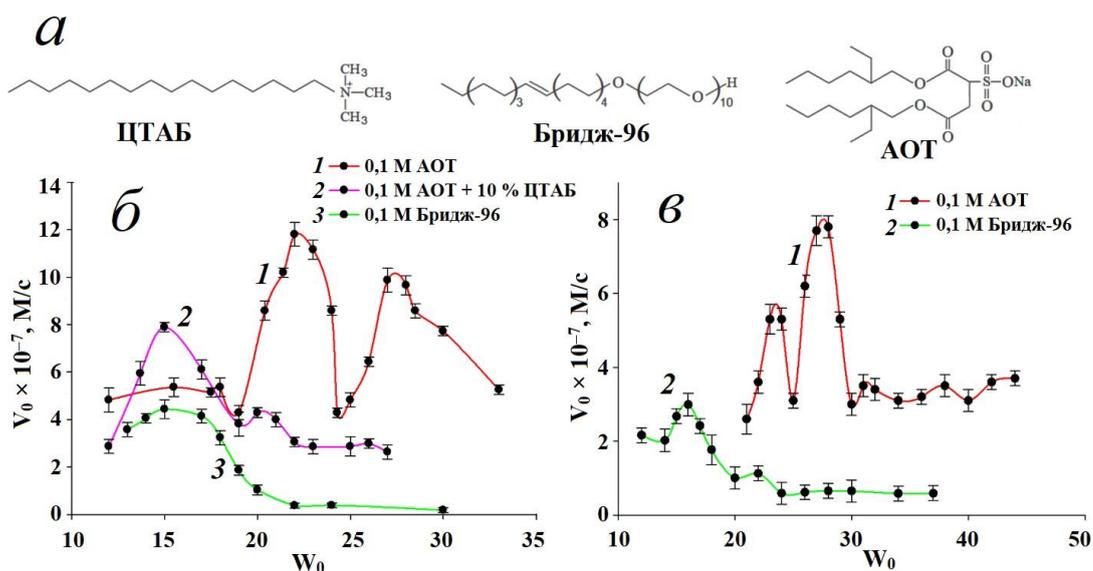
**Рисунок 5.** Спектры флуоресценции смеси AtGALDH (2,4 мкМ) и FX ( $\lambda(\text{возб.}) = 450 \text{ нм}$ ), стрелкой показано увеличение концентрации FX от 0 до 6 мМ (а); поляризация флуоресценции  $P$  смеси AtGALDH (2,4 мкМ) и FX (1–6 мМ) ( $\lambda(\text{возб.}) = 450 \text{ нм}$ ,  $\lambda(\text{эмис.}) = 530 \text{ нм}$ ) (б); обработка данных в координатах Хилла, где  $\theta = (P_{\text{образца}} - P_{\text{мин}})/(P_{\text{max}} - P_{\text{мин}})$  (в). PBS (рН 8,8); 2,4 мкМ AtGALDH; 1–6 мМ FX;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Влияние мицеллообразующего ПАВ на активность TcGAL и AtGALDH.** Важным фактором, влияющим на активность ферментов в мицеллах, является природа мицеллообразующего ПАВ: структура молекулы (конусообразная или цилиндрическая) и её заряд (катионный, анионный или нейтральный ПАВ). Строение молекулы ПАВ, как и в случае липидов, влияет на структуру, образуемую ПАВ. Малая полярная «голова» и объёмные разветвлённые «хвосты» АОТ способствуют образованию обращённых мицелл, в то время как молекулы ЦТАБ, напротив, обладают большой «головой» и склонны формировать прямые мицеллы. Молекулы цилиндрического типа, такие как Бридж-96, склонны формировать ламеллярные структуры.

В представленной работе изучено функционирование TcGAL и AtGALDH в мицеллах на основе нейтрального и катионного ПАВ на примере Бридж-96 и ЦТАБ. В случае как TcGAL, так и AtGALDH (рис. б) при использовании нейтрального ПАВ Бридж-96 или смешанных мицелл, содержащих ЦТАБ, в профилях активности обоих ферментов наблюдается один основной пик при низких степенях гидратации ( $W_0 < 20$ ),

то есть регистрируется функционирование только мономерной формы. Отметим, что стабильные фермент-содержащие мицеллы на основе Бридж-96 формируются при низких степенях гидратации ( $W_0 < 20$ ), при более высоких  $W_0$  наблюдается фазовое расслоение системы.

Наблюдаемая активация мономерной формы TcGAL при  $W_0 = 15$  в случае ЦТАБ-содержащих мицелл, вероятно, как и в случае ФХ и ФЭ, обусловлена положительным зарядом ЦТАБ («разбавляющим» отрицательный заряд поверхности раздела фаз у АОТ). Усиление ферментативной активности в ЦТАБ-содержащих мицеллах наблюдалось и ранее для других описанных в литературе ферментов – тирозиназы и холестеролоксидазы, в случае которых в диапазоне  $W_0 = 10–20$  использование мицелл на основе ЦТАБ обеспечивало большую активность фермента по сравнению с мицеллами АОТ. Следует отметить, что разница во влиянии ЦТАБ и липидов ФХ и ФЭ обусловлена склонностью к образованию различных надмолекулярных структур этих ПАВ: в силу геометрических характеристик ЦТАБ (объёмная полярная голова и узкий гидрофобный «хвост») склонен к образованию прямых мицелл, в то время как ФХ и ФЭ имеют тенденцию к образованию ламеллярной структуры и обращённых мицелл соответственно. Таким образом, изменение активности фермента в присутствии ЦТАБ объясняется его влиянием на структуру обращённых мицелл АОТ: локальным изменением радиуса кривизны и формированием дефектов в мицеллярной матрице (существенно в большей степени, чем в случае ФХ и ФЭ).



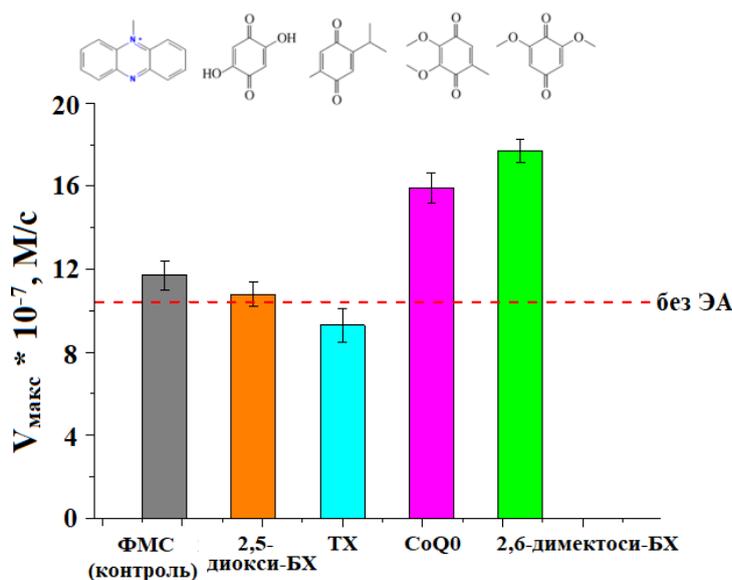
**Рисунок 6.** Влияние природы мицеллообразующего ПАВ (**а**) на активность TcGAL (**б**) и AtGALDH (**в**) в мицеллах. [AtGALDH] =  $6 \times 10^{-9}$  М и [ГЛ] = 1 мМ (**б**) и [TcGAL] = 34 нМ и [АЛ] = 1 мМ (**в**). 120 мкМ ФМС; 120 мкМ ДХФИФ; рН 8,8;  $\lambda = 550$  нм; 25 °С.

**Влияние производных 1,4-бензохинона и коэнзимов Q на активность TcGAL.** Важным фактором, влияющим на активность ферментов, является действие эффекторов, которые, согласно литературным данным, могут многократно усиливают активность мембранных ферментов. Кроме того, каталитическая активность существенно зависит от природы ЭА (второго субстрата), который, в отличие от эффектора, расходуется в ходе реакции, что можно определить по изменению поглощения ЭА при его переходе из окисленной в восстановленную форму.

С применением разработанного подхода для изучения функционирования TcGAL и AtGALDH в мицеллярных системах нами изучено влияние ряда эффекторов: производных БХ и коэнзимов Q, которые являются природными ЭА для ряда мембранных ферментов и играют роль переносчиков электронов в

дыхательной цепи. Полученные зависимости максимальной активности TcGAL от структуры вышеперечисленных эффекторов или потенциальных ЭА представлены на рис. 7.

Наибольшее значение активности TcGAL наблюдается в случае 2,6-диметокси-БХ, а тимохинон (ТХ), напротив оказывает слабое ингибирующее действие (20 % ингибирование при 200 мкМ ТХ), что можно объяснить наличием гидрофобной изопропиловой группы (отсутствует у остальных производных БХ), которая экранирует ТХ от взаимодействия с сайтом связывания с TcGAL. Примечательно, что максимальная активность TcGAL при использовании коэнзима Q<sub>0</sub> (CoQ<sub>0</sub>) наблюдается при концентрациях на 1-3 порядка меньше, чем в случае других ЭА. Таким образом, наиболее эффективным ЭА среди изучаемых соединений оказывается 2,6-диметокси-БХ. Наблюдаемые различия во влиянии изучаемых соединений на активность TcGAL могут быть обусловлены их разной эффективностью в отношении оксидазной и дегидрогеназной активностей TcGAL.



**Рисунок 7.** Зависимость активности TcGAL в 0,1 М АОТ в н-октане (рН 8,8,  $W_0 = 22$ ) от структуры ЭА. Условия: [АЛ] = 1 мМ, [ДХФИФ] = 120 мкМ и [TcGAL] = 34 нМ.

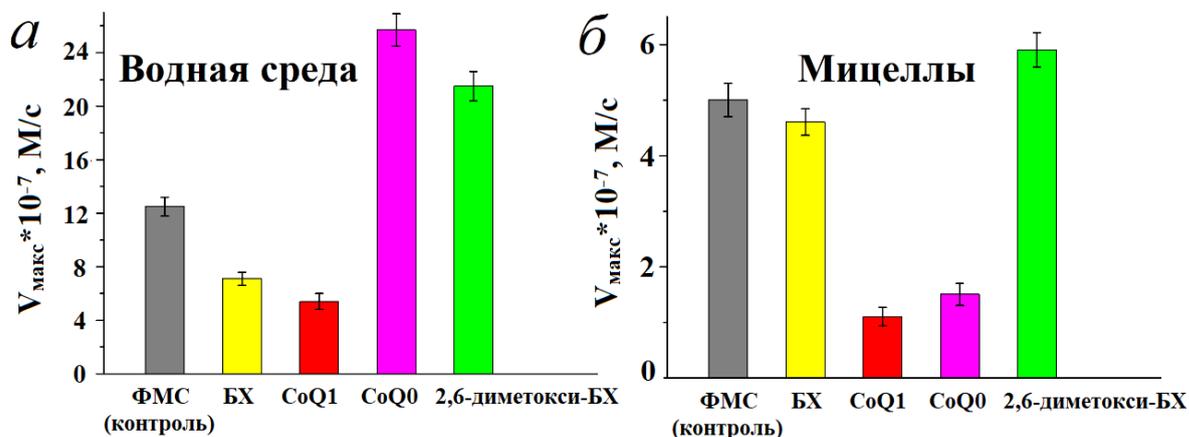
**Влияние 1,4-бензохинона и его производных, коэнзимов Q, на оксидазную и дегидрогеназную активности природной и мутантной форм AtGALDH.** Более высокая эффективность 2,6-диметокси-БХ и СоQ<sub>0</sub> по сравнению с остальными эффекторами может быть связана с тем, что мицеллярная матрица может оказывать влияние на распределение компонентов системы. Также возможно неодинаковое воздействие 2,6-диметокси-БХ и СоQ<sub>0</sub> на оксидазную и дегидрогеназную активности TcGAL.

С целью определить влияние эффекторов на оксидазную и дегидрогеназную активности TcGAL, мы использовали две формы гомологичного фермента AtGALDH: природную (дегидрогеназа) и мутантную ((A113G), обладает дегидрогеназной и оксидазной активностями).

Использование 2,6-диметокси-БХ и СоQ<sub>0</sub> в качестве ЭА показывает преимущества по сравнению с ФМС в плане усиления активности фермента. Так, в водной среде максимальная скорость в присутствии 2,6-диметокси-БХ или СоQ<sub>0</sub> выше в  $\approx 2$  раза по сравнению с ФМС, а в мицеллярной – сопоставима (рис. 8). Используемые концентрации 2,6-диметокси-БХ и СоQ<sub>0</sub> (0,01-10 мкМ) также значительно ниже, чем для ФМС (120 мкМ). В случае природной формы AtGALDH (дегидрогеназа) в обеих средах 2,6-диметокси-БХ и СоQ эффективны при низких концентрациях (0,01 – 10 мкМ), в то время как БХ и коэнзим Q<sub>1</sub> (СоQ<sub>1</sub>) действуют лишь при концентрациях порядка 2 мМ (рис. 8). Отметим, что все исследуемые соединения

(ФМС, БХ, CoQ<sub>0</sub>, CoQ<sub>1</sub> и 2,6-диметокси-БХ) являются ЭА, а не активаторами, поскольку дегидрогеназа AtGALDH не функционирует в отсутствие ЭА.

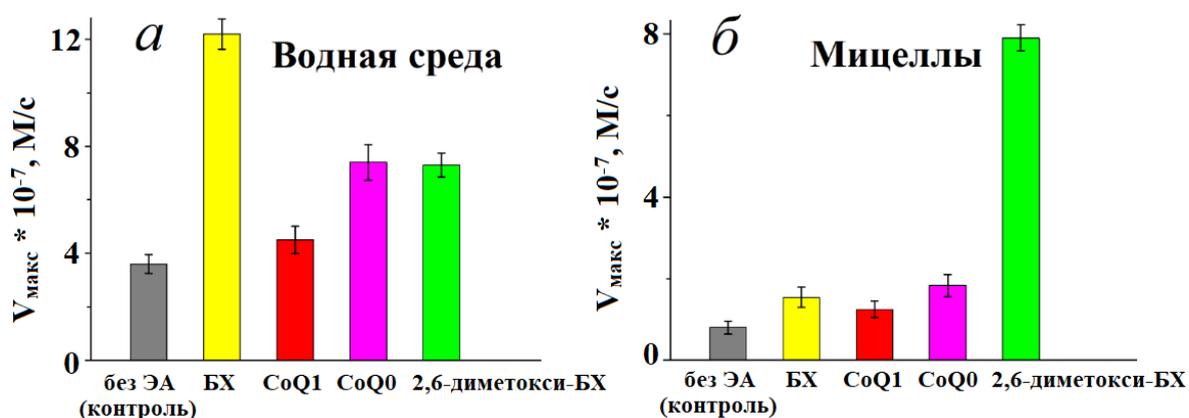
Помимо уже упомянутых производных 1,4-БХ и коэнзимов Q<sub>0</sub> и Q<sub>1</sub> интерес представляет CoQ<sub>10</sub>. Предполагалось, что CoQ<sub>10</sub>, отличаясь от CoQ<sub>1</sub> только наличием фрагмента из девяти изопреновых звеньев, также усиливает каталитическую активность AtGALDH. Однако, несмотря на значительную разницу коэффициентов молярного поглощения окисленной и восстановленной форм ( $\epsilon = 9\,900\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  при  $\lambda = 275\text{ nm}$ ), CoQ<sub>10</sub> не проявил себя в плане усиления активности AtGALDH.



**Рисунок 8.** Активность AtGALDH дикого типа в натрий-фосфатный буфере (а) в мицеллярной системе (0,1 М АОТ в н-октане,  $W_0 = 22$ ) (б) в зависимости от структуры ЭА. [ГЛ] 1 мМ, [ДХФИФ] 120 мкМ и [AtGALDH] 6 нМ.

Однако CoQ<sub>10</sub> влияет на профиль активности AtGALDH в системе обращенных мицелл АОТ: в присутствии CoQ<sub>10</sub> при  $W_0 > 26$  (в области существования димерной формы фермента) оптимума активности в мицеллярной в системе не наблюдается, в то время как эффект CoQ<sub>10</sub> в отношении мономерной формы AtGALDH ( $W_0 = 23\text{--}24$ ) не выражен. Этот эффект может быть связан с влиянием CoQ<sub>10</sub> как на структуру мицеллярной матрицы (за счет включения CoQ<sub>10</sub> в монослой ПАВ), так и на сам фермент, подавляя его межсубъединичные взаимодействия. Таким образом, добавление CoQ<sub>10</sub> позволяет регулировать олигомерный состав AtGALDH (препятствует образованию димерной формы).

Чтобы выяснить влияние 1,4-бензохинона и его производных в отношении оксидазной активности TcGAL, мы использовали мутантную форму AtGALDH (A113G), с дегидрогеназной и оксидазной активностями. В водной среде наибольший эффект на каталитическую активность AtGALDH (A113G) оказывает БХ, усиливающий активность в 3 раза (рис. 9, (а)).



**Рисунок 9.** Максимальная активность AtGALDH ((A113G) (натрий-фосфатный буфер, pH 8,8 для CoQ<sub>0</sub> и 2,6-диметокси-1,4-БХ и pH 7,8 для CoQ<sub>1</sub> и БХ) (а) и мицеллярной (0,1 М АОТ в н-октане, pH 8,8 для CoQ<sub>0</sub> и 2,6-диметокси-1,4-БХ и pH 7,8 для CoQ<sub>1</sub> и БХ,  $W_0 = 22$ ) (б) средах в зависимости от структуры ЭА. [ГЛ] = 1 мМ, [ДХФИФ] = 120 мкМ и [AtGALDH] = 6 нМ.

В мицеллярных системах существенное влияние оказывает 2,6-диметокси-БХ, усиливающий активность мутантной формы AtGALDH в 10 раз (рис. 9, (б)). Отметим, что все исследуемые соединения являются ЭА для дегидрогеназной формы AtGALDH (рис. 8), поэтому в случае AtGALDH (A113G), тоже обладающей дегидрогеназной активностью, данные соединения также проявляют ЭА свойства.

Сравнивая результаты, полученные для дикой и мутантной форм AtGALDH, следует подчеркнуть, что в мицеллах обе формы наиболее активны в присутствии 2,6-диметокси-БХ и его влияние на оксидазную активность более выражено, чем на дегидрогеназную.

**Кверцетин и дигидрокверцетин как эффекторы TcGAL.** Помимо производных БХ и коэнзимов Q, интерес представляют такие эффекторы дегидрогеназ, как природные флавоноиды, кверцетин (КЦ) и дигидрокверцетин (ДКЦ), играющие важную роль в живых организмах и подавляющие рост *T. cruzi*. Обнаружено, что КЦ и ДКЦ усиливают активность TcGAL (табл. 3), что может быть следствием действия этих соединений как активаторов фермента, либо как ЭА.

**Таблица 3.** Каталитические параметры TcGAL и AtGALDH для разных эффекторов. Условия для AtGALDH как в табл. 1. [TcGAL] = 35 нМ, [АЛ] = 1 мМ, [ДХФИФ] = 120 мкМ, 0,1 М АОТ в октане  $W_0 = 22$ ).

Фермент	Эффектор	$V_{\max} \cdot 10^{-7}$ , М/с	$K_{\text{связ}}^*$ , мкМ
TcGAL	КЦ	$28 \pm 2$	$192 \pm 4$
	ДКЦ	$24 \pm 3$	$147 \pm 6$
AtGALDH	ФМС	$12 \pm 2$	$28 \pm 1$
	БХ	$5 \pm 1$	$400 \pm 30$
	Цитохром С** для водной среды	$13 \pm 2$	$71 \pm 2$

\* наблюдаема константа связывания эффектора

Чтобы выяснить, какую роль играют КЦ и ДКЦ – активаторы или ЭА, были получены их УФ-спектры до и после восстановления  $\text{NaBH}_4$  и УФ-спектры реакционной смеси, содержащей КЦ или ДКЦ, до и после реакции. После протекания реакции форма УФ-спектра реакционной смеси меняется незначительно, что свидетельствует о роли КЦ и ДКЦ в случае TcGAL скорее как активаторов, а не ЭА.

Отметим, что выше изученное влияние эффекторов (КЦ, ДКЦ) и ЭА ряда 1,4-бензохинона в отношении TcGAL и AtGALDH позволяет эффективно регулировать их каталитические свойства, однако особый интерес представляют ингибиторы TcGAL как потенциальные лекарства против болезни Шагаса.

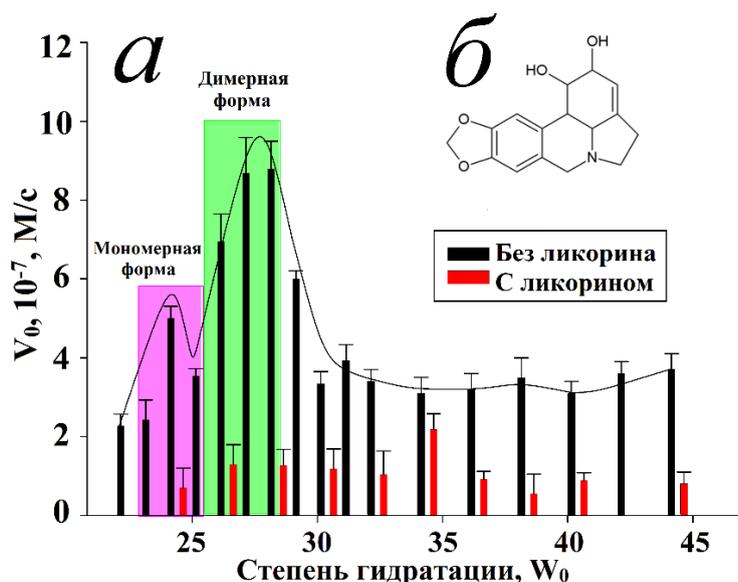
**Ингибирование TcGAL и AtGALDH ликорином.** Разработанный подход к измерению активности TcGAL и AtGALDH и его применение для изучения возможных эффекторов TcGAL и AtGALDH позволяют вести поиск ингибиторов TcGAL – потенциальных лекарств против болезни Шагаса. Ликорин, природный алкалоид, обладает анти-трипаносомными свойствами ( $IC_{50} = 0,7$  мкМ) и ингибирует ряд L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназ, гомологичных как AtGALDH, так и TcGAL. Кроме того, ликорин обладает противовоспалительными, противовирусными, антибактериальными и многими другими свойствами фармакологического действия, поэтому мы решили изучить действие ликорина в отношении изучаемых AtGALDH и TcGAL.

**Таблица 4.** Каталитические параметры систем для определения механизма ингибирования AtGALDH ликорином.

[Ликорин]*, мМ	$K_M$ (ГЛ), мМ	$k_{кат}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{кат}/K_M$ , (мМ <sup>-1</sup> · с <sup>-1</sup> )	$K_{I(конкур)}$ , мМ	$K_{I(неконкур)}$ , мМ
0	0,063 ± 0,007	205 ± 6	$3,3 \cdot 10^3$	0,017 ± 0,002	0,237 ± 0,031
0,5	0,220 ± 0,021	125 ± 4	$5,7 \cdot 10^2$		
1	0,665 ± 0,086	40 ± 1	6,0		

\*в качестве примера приводятся три значения концентрации ликорина (0, 0,5 и 1 мМ), [AtGALDH] = 6 нМ.

Обнаружено, что ликорин оказывает ингибирующий эффект в отношении модельного AtGALDH в водной среде. Анализ каталитических параметров фермента в присутствии ингибитора (табл. 4) указывает на смешанный механизм действия ликорина в отношении AtGALDH. Рассчитанные значения констант конкурентной и неконкурентной составляющих ингибирования  $K_{I(конк)} = 0,017 \pm 0,01$  мМ и  $K_{I(неконкур)} = 0,237 \pm 0,09$  мМ, а также увеличение  $K_M$  и снижение  $V_{макс}$  ( $k_{кат}$ ) при увеличении концентрации ликорина говорят о преобладании конкурентного ингибирования над неконкурентным. Обнаружено, что ликорин также ингибирует AtGALDH в мицеллах АОТ, при степенях гидратации  $W_0 = [ПАВ]/[H_2O]$ , равных 23-25 и 26-28, при которых AtGALDH функционирует в мономерной и димерной формы (рис. 10). Сравнение полученных данных в мицеллярной среде с данными в водной системе показывает, что ликорин ингибирует AtGALDH вне зависимости от используемой среды.



**Рисунок 10.** (а) — зависимость активности AtGALDH от  $W_0$  в отсутствие и в присутствии 800 мкМ ликорина, 0,1 М АОТ в н-октане, (б) — структура ликорина. [AtGALDH] =  $6 \cdot 10^{-9}$  М и [ГЛ] = 1 мМ.

Исследование влияния ликорина на целевой TcGAL показало, что TcGAL – как и модельный AtGALDH – ингибируется ликорином (рис. 11). В диапазоне концентраций ликорина 0,1–300 мкМ в случае TcGAL наблюдается «лаг-фаза», отсутствующая в случае AtGALDH, но существенное ингибирование наблюдается примерно при одной и той же концентрации для обоих ферментов.

Причины различия в ингибировании TcGAL и AtGALDH при относительно низких концентрациях ликорина (< 300 мкМ) не до конца ясны. Возможная причина заключается в том, что оксидазная активность TcGAL не ингибируется ликорином (AtGALDH, в отличие TcGAL, обладает только дегидрогеназной активностью).

Подчеркнём, что ингибирование ликорином наблюдается при высоких концентрациях (более 400 мкМ) для обоих ферментов, требуется поиск более эффективных ингибиторов с  $IC_{50}$  порядка 10 мкМ.

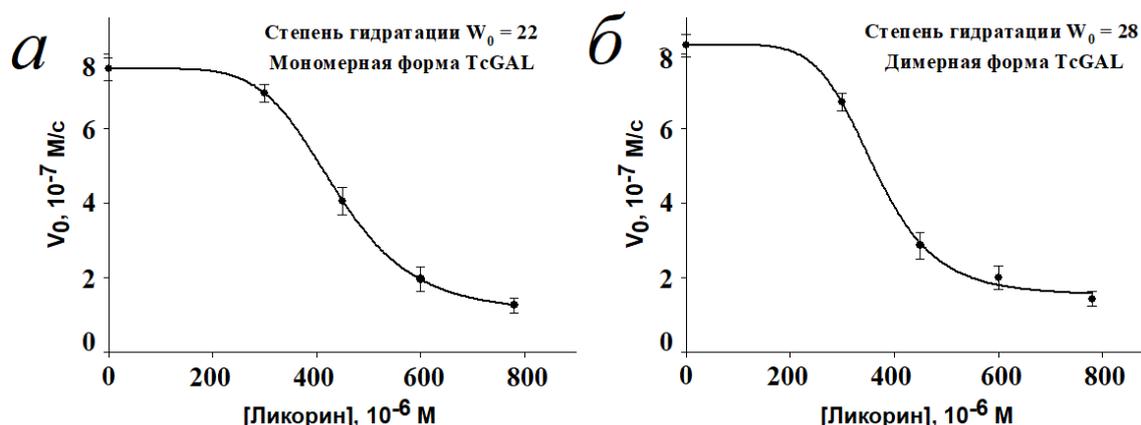


Рисунок 11. Ингибирование ТсGAL ликорином при  $W_0 = 22$  (а) и  $W_0 = 28$  (б).  $[TcGAL] = 3,5 \times 10^{-5}$  М и  $[AL] = 1$  мМ.

### Ингибирование ТсGAL аллилполиалкоксибензолами (АПАБ) и производными аллилбензола.

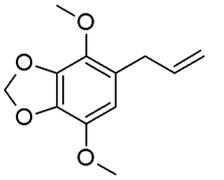
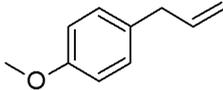
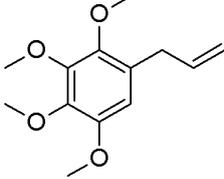
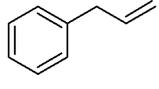
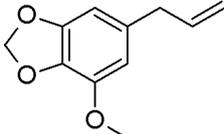
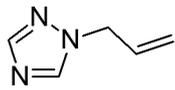
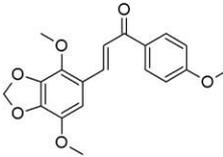
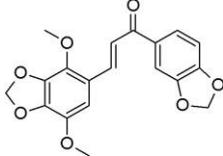
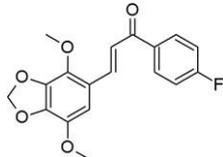
Перспективным классом соединений в качестве предполагаемых ингибиторов ТсGAL являются аллилполиалкоксибензолы (АПАБ), выделенные из растительных источников (*Anethum graveolens* L.), обладающие биологической активностью, в том числе противовоспалительной, противомикробной и др. В частности, диллапиол (основной компонент экстракта листьев *Piper aduncum*) обладает антилейшманийной активностью с  $IC_{50} = 60$  мкМ. Можно предположить, что диллапиол и, возможно, другие АПАБ будут проявлять антирипаносомную активность.

Другим важным классом соединений являются аллилбензол и его аналоги – так, показано, что близкий изомер аллилбензола, *транс*-пропенилбензол, ингибирует рост *T.cruzi* с  $IC_{50} > 25$  мкМ, поэтому соединения ряда аллилбензола также представляют интерес как потенциальные ингибиторы ТсGAL.

Нами изучено влияние на ТсGAL соединений ряда АПАБ (апиола, диллапиола, миристицина, аллитетраметоксибензола (АТМБ)) и соединений ряда аллилбензола (эвгенол, эстрагол, аллилбензол и 1-аллил-1,2,4-триазол), различающихся количеством и положением метоксигрупп и наличием метилendioкси-группы (табл. 5).

Таблица 5. Ингибирующий эффект ( $IC_{50}$ ) в отношении ТсGAL соединениями ряда АПАБ, производных аллилбензола и хальконов.

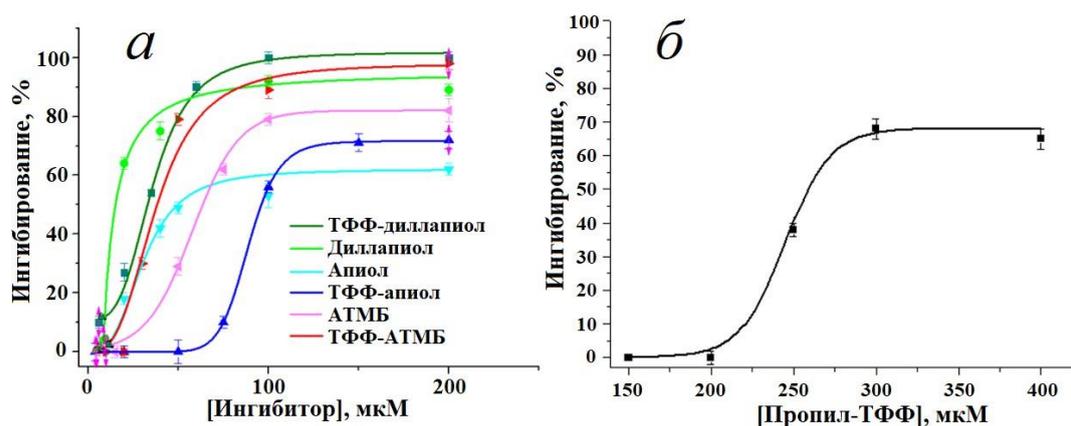
АПАБ			Аллилбензол и его аналоги		
Соединение	Структура	$IC_{50}$ , мкМ	Соединение	Структура	$IC_{50}$ , мкМ
Диллапиол		20	Эвгенол		10

Апиол		50	Эстрагол		20
АТМБ		65	Аллилбензол		60
Миристицин		130	1-аллил-1,2,4-триазол		75
<b>Халконы</b>					
<b>Соединение</b>		<b>Структура</b>		<b>IC<sub>50</sub>, мкМ</b>	
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	

Наибольший ингибирующий эффект среди АПАБ оказывает диллапиол ( $IC_{50} = 20$ ). Апиол и сходный с ним по положению боковых метокси-групп АТМБ оказывают сравнимый эффект ( $IC_{50} = 50$  мкМ и 65 мкМ соответственно), что свидетельствует о не обязательном наличии метилендиокси-группы для ингибирования TcGAL. В качестве контроля использовали некоторые соединения ряда халконов, в частности, 2,5-диметокси-3,4-метилендиокси-4',5'-метилендиоксихалкон, обладающий двумя метилендиоксигруппами. Однако исследуемые халконы слабо ингибировали TcGAL. В то же время аллилбензол, АТМБ и 1-аллил-1,2,4-триазол обладают эффектом ( $IC_{50} = 60$ -75 мкМ), сравнимым с действием апиола и АТМБ ( $IC_{50} = 50$ -60 мкМ), что указывает на важную роль аллильного заместителя в структуре ингибитора. Кроме того, значительную роль играет наличие метокси-групп: так, в случае эстрагола, обладающего «дополнительной» метокси-группой, значение  $IC_{50} = 20$  мкМ в 3-4 раза меньше по сравнению с таковым для аллилбензола и 1-аллил-1,2,4-триазола ( $IC_{50} = 60$  и 75 мкМ соответственно, табл. 5).

**Ингибирование TcGAL ТФФ-конъюгатами АПАБ.** Для усиления ингибирующего эффекта использовали конъюгаты изучаемых соединений с трифенилфосфониевым (ТФФ) катионом, который, согласно литературным данным, обеспечивает селективную доставку биологически активных молекул, подвижных отрицательным трансмембранным потенциалом, в митохондрии. Мы предположили, что в

случае конъюгатов АПАБ с ТФФ будет наблюдаться сходный эффект за счёт связывания катионного фрагмента ТФФ с отрицательно заряженной поверхностью раздела фаз в мицеллах АОТ. Показано, что максимальный процент ингибирования ТсGAL ТФФ-конъюгатами апиола и диллапиола на 10–15% выше, чем немодифицированными молекулами (рис. 12, (а)). Сам пропил-ТФФ также оказывает ингибирующий эффект в отношении ТсGAL (рис. 12 (б)), но в гораздо более высокой концентрации, чем АПАБ ( $IC_{50} = 275$  мкМ и 50–70 мкМ, соответственно). По-видимому, положительный заряд ТФФ способствует концентрированию конъюгатов на отрицательно заряженной поверхности раздела фаз, как это реализуется и в случае митохондриальных мембран. Кроме того, ТФФ может влиять на распределение ингибитора в мицеллярной системе и его пространственную ориентацию на поверхности раздела фаз, где локализован ТсGAL.



**Рисунок 12.** Ингибирующий эффект ТсGAL соединениями класса АПАБ: (а) – ингибирование диллапиолом, ТФФ-диллапиолом, аллилтетраметоксibenзолом, ТФФ-аллилтетраметоксibenзолом, апиолом и ТФФ-апиолом; (б) ингибирование пропил-ТФФ.

**Локализация и пространственная ориентация ингибиторов ТсGAL.** Для выяснения расположения и пространственной ориентации функциональных групп изучаемых ингибиторов в мицеллах использовали метод ИК-спектроскопии Фурье. Согласно данным ИК-спектроскопии, микроокружение метилendioкси-группы и метоксигрупп диллапиола, а также тетраметоксibenзольного фрагмента АТМБ в большей степени соответствует водной фазе, следовательно, в системе обращённых мицелл АОТ эти функциональные группы направлены во внутреннюю полость мицелл. Аллильный радикал данных ингибиторов заякорен на поверхности раздела фаз, окружён гидрофобными цепями мицелл, согласно изменениям в полосе при  $1645\text{ см}^{-1}$ , характерной для колебаний С=C аллильной группы. Пропил-ТФФ в мицеллах распределён между водной и органической фазой. Положение пиков ТФФ-АТМБ в мицеллах свидетельствует о том, что окружение тетраметоксibenзола – преимущественно гидрофильное, а ТФФ-фрагмент расположен на поверхности раздела фаз, что обуславливает «заякоривание» в мицеллярной матрице и пространственную ориентацию ТФФ-АТМБ.

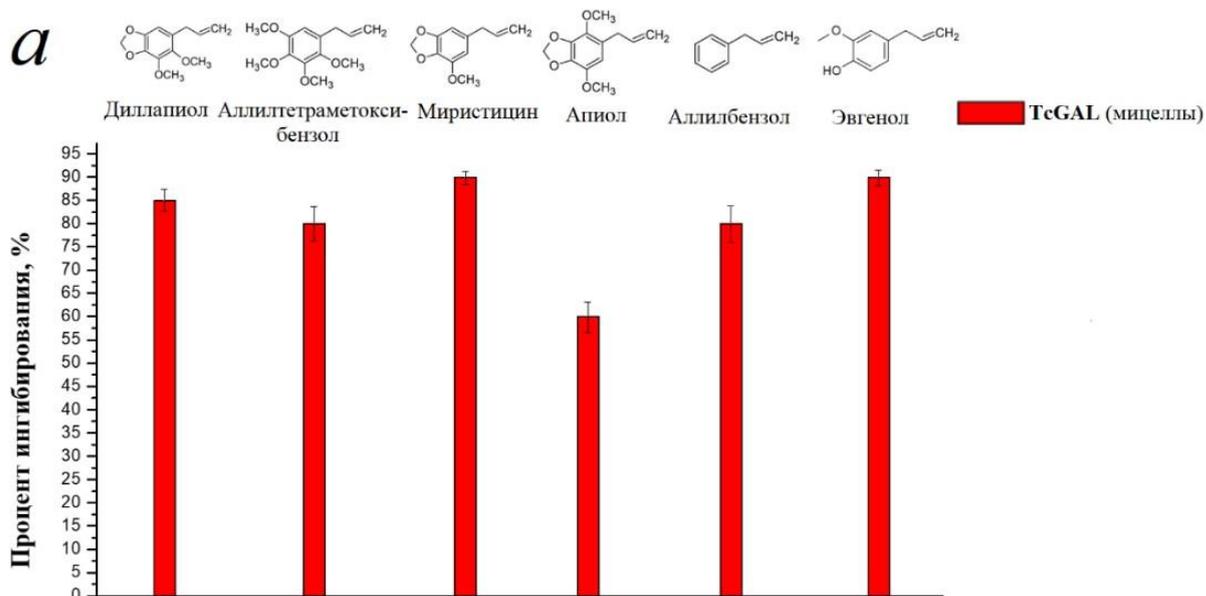
**Определение механизма ингибирования ТсGAL апиолом.** Важным аспектом ингибирования ТсGAL АПАБ является механизм их действия. На примере апиола как представителя АПАБ установлен неконкурентный механизм ингибирования ТсGAL с константой ингибирования  $K_I = 0,043\text{ мМ}$  (табл. 6) что хорошо соотносится с параметром  $IC_{50} = 50\text{ мкМ}$  данного ингибитора.

**Таблица 6.** Каталитические параметры систем, использованных для определения механизма ингибирования TcGAL апиолом. Концентрации АЛ 0,25–1 М, апиола 0-50 мкМ, [TcGAL] = 34 нМ.

[Апиол], мкМ	$K_M$ (АЛ), мМ	$k_{кат} / K_M \cdot 10^3, (мМ^{-1} \cdot с^{-1})$	$K_I$ , мМ
0	0,14	2,9	0,043 ± 0,003
30		1,8	
50		1,4	

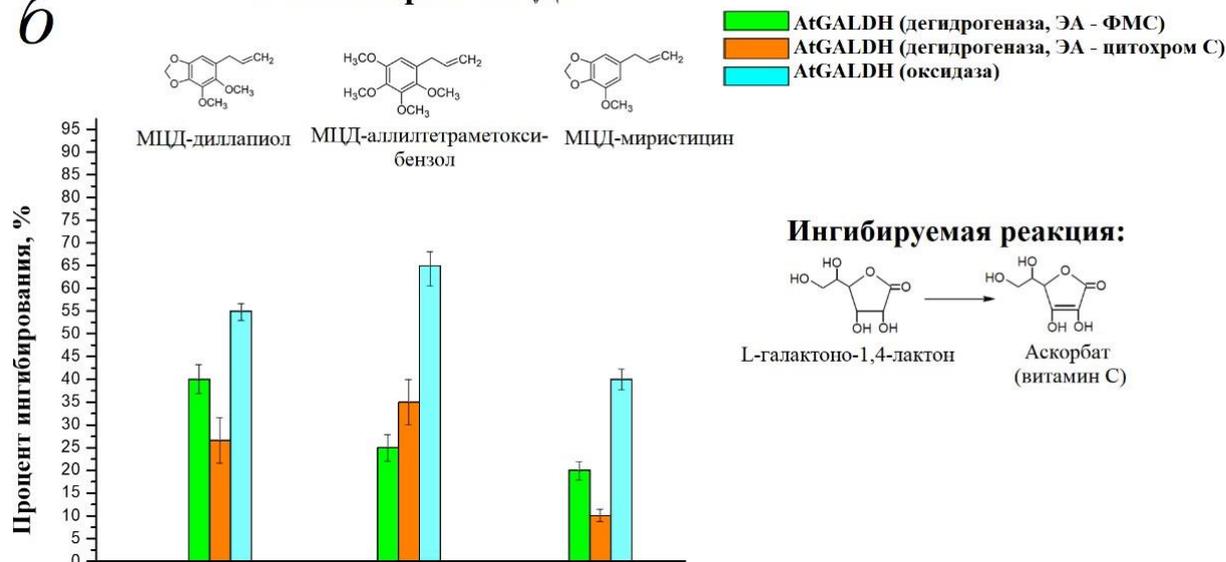
**Влияние АПАБ на оксидазную и дегидрогеназную активности TcGAL и AtGALDH.** Неполное ингибирование TcGAL соединениями ряда АПАБ может быть связано с тем, что ингибиторы подавляют преимущественно одну из активностей TcGAL (дегидрогеназную или оксидазную). Для выяснения, на какой из видов активности TcGAL (оксидазную или дегидрогеназную) влияют ингибиторы АПАБ и как это зависит от структуры ингибитора, исследовали влияние АПАБ на каталитическую активность модельного фермента AtGALDH для дегидрогеназной и мутантной (оксидазной) форм (рис. 13).

В отличие от TcGAL, в мицеллярной системе обе формы AtGALDH практически не ингибируются АПАБ (<10%). В водной среде АПАБ также слабо влияют на активность обеих форм AtGALDH (<10%), что может быть связано с низкой растворимостью АПАБ в воде. Для повышения растворимости АПАБ использовали метил-β-циклодекстрина (МЦД), который способен формировать комплексы включения гость-хозяин с ароматическими соединениями (в т.ч. АПАБ), что позволило повысить растворимость АПАБ и добиться усиления эффективности ингибирования обеих форм AtGALDH (рис. 13). Показано, что для всех изученных ингибиторов форма AtGALDH с оксидазной активностью ингибируется комплексами АПАБ с МЦД на 15–50% сильнее, чем AtGALDH-дегидрогеназа.



6

## Ингибиторы с МЦД:



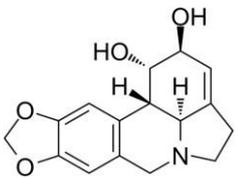
**Рисунок 13.** Влияние АПАБ в комплексе с МЦД на активность AtGALDH (оксидазной и дегидрогеназной форм) в водно-буферном растворе pH 8,8. [АЛ] = [ГЛ] = 1 мМ, [ФМС] = 120 мкМ, [ДХФИФ] = 120 мкМ, [цитохром С] = 50 мкМ, [АПАБ] = 500 мкМ, [AtGALDH] = 6 нМ, [TcGAL] 30 нМ.

Из полученных данных следует, что в случае TcGAL, соединения ряда АПАБ оказывают большее влияние на оксидазную активность. Это объясняет неполное ингибирование TcGAL соединениями ряда АПАБ (наличие остаточной дегидрогеназной активности).

**Корреляция результатов работы с ингибированием микроорганизма *Trypanosoma cruzi*.** Для оценки эффективности TcGAL как фермента-мишени в случае наших ингибиторов представляется логичным сравнить  $IC_{50}$  для TcGAL и приведённые в литературе значения  $IC_{50}$  для самой *T. cruzi* ( $IC_{50}$  для микроорганизма *T. cruzi* – концентрация ингибитора, вызывающая 50 % снижение роста микроорганизма). Полученные значения  $IC_{50}$  для изучаемых соединений (аллилбензол и диллапиол) в отношении TcGAL близки к таковым для самой трипаносомы и родственных паразитов (табл. 7), что позволяет рассматривать ингибирование TcGAL как ключевой механизм действия этих соединений в подавлении роста *T. cruzi*.

**Таблица 7.** Сравнение результатов ингибирования TcGAL и AtGALDH с литературными данными по ингибированию *T. cruzi* и родственных микроорганизмов.

Ингибитор	Структура	$IC_{50}$ для микроорганизма, мкМ (лит. данные)*	$IC_{50}$ для TcGAL, мкМ	$IC_{50}$ для AtGALDH, мкМ
Аллилбензол		> 25	60	-
Диллапиол		60	20	-
Апиол		-	50	35

Ликорин		0,7	450	500
---------	---	-----	-----	-----

\* doi: 10.1021/jm800812k, doi: 10.1002/ardp.201200212, doi: 10.1186/s13071-020-04171-6

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате проделанной работы разработана эффективная методика определения активности TcGAL и AtGALDH в системе обращённых мицелл АОТ, что позволило исследовать влияние электроноакцепторов и эффекторов на активность данных ферментов и – в рамках практического приложения – провести скрининг потенциальных ингибиторов TcGAL. Впервые найдены классы эффективных ингибиторов TcGAL – аллилполиалкоксибензолы и соединения ряда аллилбензола, ингибирующие фермент при концентрациях 10-100 мкМ. Некоторые из этих соединений (например, диллапиол) подавляют рост микроорганизма *T.cruzi* в том же диапазоне концентраций, что позволяет рассматривать TcGAL как мишень для лекарств против болезни Шагаса. С использованием двух форм гомологичного AtGALDH, природной и мутантной, установлены конкурентный и неконкурентный механизмы ингибирования TcGAL ликорином и апиолом соответственно. Полученные результаты проливают свет на многие аспекты функционирования TcGAL и AtGALDH и могут использоваться для целенаправленного поиска ингибиторов TcGAL, являющихся основной для разработки лекарств.

## **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОЛЫ**

1. Разработана методика измерения активности AtGALDH и TcGAL с использованием обращённых мицелл АОТ с применением комбинации электроноакцептора (феназинметосульфата) и красителя (2,6-дихлорфенолиндофенола). Данная методика характеризуется высокой чувствительностью, отсутствием фонового сигнала и устойчивостью электроноакцептора в мицеллярной системе.

2. Обнаружено выраженное влияние состава мицеллярной матрицы на активность AtGALDH и TcGAL: включение фосфолипидов фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в мицеллярную систему приводит к изменению профиля активности за счёт снижения плотности отрицательного заряда на границе раздел фаз, а также за счёт формирования липопротеидных комплексов.

3. Установлено, что природа мицеллообразующего ПАВ влияет на олигомерный состав AtGALDH и TcGAL: в мицеллах АОТ для обоих ферментов наблюдаются два оптимума активности, которые соответствуют функционированию мономерной и димерной форм. В присутствии катионного ЦТАБ и нейтрального Бридж-96 в мицеллярной системе ферментов функционирует в мономерной форме.

4. Обнаружено, что коэнзимы Q<sub>0</sub>, Q<sub>1</sub>, 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинон и 2,6-диметокси-1,4-бензохинон усиливают активность TcGAL и AtGALDH, являясь электроноакцепторами. Использование 2,6-диметокси-1,4-бензохинона как электроноакцептора обеспечивает наиболее высокую максимальную скорость реакции по сравнению со всеми остальными изученными производными 1,4-бензохинона. Обнаружено, что флавоноиды, кверцетин и дигидрокверцетин, являются активаторами TcGAL.

5. Разработан подход к проведению ингибиторного анализа TcGAL. Найдены эффективные ингибиторы TcGAL ряда аллилполиалкоксибензолов (АПАБ) и ряда аллилбензола с IC<sub>50</sub> = 10-100 мкМ и

идентифицированы структурные фрагменты АПАБ, значимые для ингибирования. Аллильная и метокси-группы важны для усиления ингибирующего эффекта TcGAL. Установлены неконкурентный и конкурентный механизмы ингибирования TcGAL и AtGALDH апиолом и ликорином соответственно.

6. Обнаружено, что конъюгаты АПАБ с трифенилфосфониевым фрагментом обладают более высоким ингибирующим действием по сравнению с немодифицированными АПАБ за счет концентрирования АПАБ на границе раздел фаз несущей отрицательный заряд.

7. Сравнительное изучение действия ингибиторов на TcGAL и на модельный фермент AtGALDH (с дегидрогеназной активностью), и его мутантную форму Ala113Gly (с оксидазной активностью), показало, что аллилполиалкоксибензолы в большей степени влияют на оксидазную активность изученных ферментов.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index"

1. Chudin A.A. et al. Improved enzymatic assay and inhibition analysis of redox membranotropic enzymes, AtGALDH and TcGAL using a reversed micellar system / **Chudin A.A.**, Kudryashova E.V. // Analytica (MDPI). – 2022. – Vol. 3. – № 1. – P. 36–53. (объем 1,8 п.л., авт. вклад 90%) [Импакт-фактор Scopus SJR = 0,285] doi: 10.3390/analytica3010004.
2. Чудин А.А. и др. Влияние эффекторов 1,4-бензохинона и его производных, коэнзимов Q1 и Q10, на активность L-галактоно-1,4-лактон дегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* / **Чудин А.А.**, Кудряшова Е.В. // Биотехнология. – 2022. – Т. 38. – № 4. – С. 80–85. (объем 0,6 п.л., авт. вклад 90%) [Импакт-фактор РИНЦ = 0,552] doi: 10.56304/S0234275822040068.
3. Чудин А.А. и др. Ингибиторы галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* на основе аллилполиалкоксибензолов / **Чудин А.А.**, Злотников И.Д., Крылов С.С., Семенов В.В., Кудряшова Е.В. // Биохимия – 2023. – Т. 88. – № 1. – С. 97–109. (объем 1,3 п.л.) [Импакт-фактор РИНЦ = 2,908] (Chudin A.A. et al. Allylpolyalkoxybenzene inhibitors of galactonolactone oxidase from *Trypanosoma cruzi* / **Chudin A.A.**, Zlotnikov I.D., Krylov S.S., Semenov V.V., Kudryashova E.V. // Biochemistry (Moscow). – 2023. – Vol. 88. – № 1. – P. 131–141. (объем 1,3 п.л., авт. вклад 60 %) [Импакт-фактор Scopus SJR = 0,661] doi: 10.31857/S0320972523010074.
4. Чудин А.А. и др. Влияние состава липидной матрицы на активность мембранотропных ферментов галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* в системе обращённых мицелл / **Чудин А.А.**, Кудряшова Е.В. // Биохимия. – 2023. – Т. 88. – № 12. – С. 2457–2468. (объем 1,2 п.л.) [Импакт-фактор РИНЦ = 2,908] (Chudin A.A. et al. Impact of lipid matrix composition on activity of membranotropic enzymes galactonolactone oxidase from *Trypanosoma cruzi* and L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* in the system of reverse micelles / **Chudin A.A.**, Kudryashova E.V. // Biochemistry (Moscow). – 2023. – Vol. 88 – P. 2073–2083. (объем 1,1 п.л., авт. вклад 90%) [Импакт-фактор Scopus SJR = 0,661] doi: 10.31857/S0320972523120096.
5. Чудин А.А. и др. Влияние ингибиторов аллилполиалкоксибензолов на оксидазную и дегидрогеназную активности галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* / **Чудин А.А.**, Кудряшова Е.В. // Биотехнология. – 2023. – Т. 39 – № 3. – С. 1–6. (объем 0,6 п.л., авт. вклад 90%) [Импакт-фактор РИНЦ = 0,552] doi: 10.56304/S023427582303002X.
6. Chudin et al. Flavin-dependent dehydrogenases and oxidases: comparison of structural functional properties (a review) / **Chudin A.A.**, Kudryashova E.V. // Russian journal of bioorganic chemistry. – 2023. – Vol. 49. – № 6. – P. 1229–1242. (объем 1,4 п.л., авт. вклад 90%) [Импакт-фактор Scopus SJR = 0,224] doi: 10.1134/S1068162023060055.

7. Chudin A.A. et al. Impact of effectors on the catalytic activity of galactonolactone oxidase from *Trypanosoma cruzi* / **Chudin A.A.**, Kudryashova E.V. // Russian journal of bioorganic chemistry. – 2024. – Vol. 50. – № 4. – P. 1294–1305 (объем 1,2 п.л., авт. вклад 90%) [Импакт-фактор Scopus SJR = 0,224] doi: 10.1134/S1068162024040071.
8. Chudin A.A. et al. Flavonoids, quercetin and dihydroquercetin – activators of galactonolactone oxidase from *Trypanosoma cruzi* / **Chudin A.A.**, Kudryashova E. V. // Mendeleev Communications. – 2024. – Vol. 34. – P. 523–524. (объем 0,1 п.л., авт. вклад 90%) [Импакт-фактор Scopus SJR = 0,332] doi: 10.1016/j.mencom.2024.06.017.