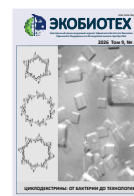




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

УДК 616.98:579.852.11



Научная статья | RESEARCH ARTICLE

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ *IN VITRO* СКРИНИНГА НЕРАСТВОРИМЫХ ИНГИБИТОРОВ МЕДИЦИНСКИ ЗНАЧИМЫХ ФЕРМЕНТОВ НА ПРИМЕРЕ L-ГАЛАКТОНО-1,4-ЛАКТОНДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Чудин А.А.¹, Кудряшова Е.В.^{1,2*}¹ Центральный университет, Москва, Россия² Химический факультет Московского Государственного
Университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*E-mail: helenakoudriachova@yandex.ru

APPLICATION OF CYCLODEXTRINS DERIVATIVES TO *IN VITRO* SCREENING OF INSOLUBLE INHIBITORS OF CLINICALLY RELEVANT ENZYMES USING L-GALACTONO- 1,4-LACTONE DEHYDROGENASE FROM *ARABIDOPSIS* *THALIANA* AS EXAMPLE

Chudin A.A.¹, Kudryashova E.V.^{1,2*}¹ Central University, Moscow, Russia² Chemistry department, Lomonosov Moscow State University,
Moscow, Russia*E-mail: helenakoudriachova@yandex.ru

Аннотация

Низкая растворимость малых органических молекул ограничивает их применение в качестве ингибиторов лекарственных ферментов-мишеней и затрудняет ингибиторный анализ этих соединений. Для преодоления этой проблемы предложен подход, основанный на использовании комплексов включения «гость-хозяин», образуемых между метилциклодекстрином (МЦД) и целевыми молекулами, что значительно повышает растворимость последних. На примере L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) показана эффективность данного подхода для улучшения ингибирующего эффекта: синтезированы комплексы МЦД с природными биоактивными соединениями терпеноидного и флавоноидного ряда (аллилполиалкоксибензолы, АПАБ), являющимися ингибиторами AtGALDH, и установлено, что комплексы АПАБ-МЦД до 12 раз сильнее ингибируют AtGALDH по сравнению с исходными АПАБ. Образование комплексов включения АПАБ с МЦД приводит к значительному усилению их ингибирующей активности, что связано с повышением растворимости этих соединений и создаёт основу для целенаправленной разработки лекарственных форм против трипаносомоза и других инфекционных заболеваний, а также позволяет проводить скрининг ингибиторов с использованием разработанного подхода на основе получения комплексов с МЦД.

Ключевые слова:

метилциклодекстрин, растворимость, терпеноиды, флавоноиды, ингибиторы, L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа, лекарства, ингибиторный анализ

Abstract

The low solubility of small organic molecules limits their use as inhibitors of medically relevant target enzymes and makes the analysis of their inhibition difficult. To overcome this problem, an approach based on the use of host-guest inclusion complexes formed between methylcyclodextrin (MCD) and target molecules is proposed, which greatly increases the solubility of the latter. The effectiveness of this approach in increasing inhibition has been demonstrated by the use of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) as an example. MCD complexes were synthesized with natural, biologically active terpenoid and flavonoid compounds (allylpolyalkoxybenzenes, APABs) that are inhibitors of AtGALDH, and the APAB-MCD complexes were found to inhibit AtGALDH up to 12-fold more effectively than the native APABs. The formation of inclusion complexes of APABs with MCD results in a significant increase in their inhibitory activity, which is related to their increased solubility, and allows for the targeted development of drugs against trypanosomiasis and other infectious diseases, as well as enables screening of inhibitors using the developed approach based on the formation of complexes with MCD.

Keywords:

methylcyclodextrin, solubility, terpenoids, flavonoids, inhibitors, L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, drugs, inhibitor analysis

Поступила в редакцию: 14.08.2026

Принято в печать: 23.09.2026

Received: 14.08.2026

Accepted: 23.09.2026

Цитировать | Cite as

DOI: <http://doi.org/10.31163/2618-964X/2026-34> EDN: <https://www.elibrary.ru/xzlyqb>

ВВЕДЕНИЕ

Проблема растворимости органических лекарственных ароматических молекул в водных буферных растворах, подходящих для определения активности ферментов, ограничивает и затрудняет ингибиторный анализ лекарственных ферментов-мишеней, и, как следствие, усложняет разработку новых лекарств и терапевтических подходов. Так, *in vitro* оценка эффективности противораковых препаратов, ингибирующих киназы, часто лимитируется их плохой растворимостью в воде. Например, палбоциклиб и рибоциклиб, которые нацелены на CDK4/6 (ключевой регулятор клеточного цикла), уже используются для лечения рака молочной железы, но характеризуются плохой растворимостью в водной среде, что ограничивает их эффективность при пероральном введении [Spiewok *et al.* 2025]. Другим интересным случаем являются ингибиторы одного из важнейших ферментов клеточной стенки – декапренилфосфорил- β -D-рибозы 2'-оксидазы (DprE1). Так, соединение PBTZ169, относящееся к классу бензотиазинонов (BTZ) и построенное на их структурном каркасе, уничтожает *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) посредством ингибирования DprE1 и демонстрирует высокую эффективность в экспериментах на животных и в пилотных клинических испытаниях. Однако, несмотря на доказанный эффект, ингибиторы DprE1 типа BTZ в целом отличаются крайне низкой растворимостью в воде, что ограничивает их терапевтическую эффективность и потенциал в качестве лекарств [Fan *et al.* 2023].

При этом традиционные подходы к солюбилизации, такие как добавление органических соразтворителей (ДМСО, метанол и др.), часто приводят к инаktivации фермента [Doukyu, Ogino 2010] и токсическому эффекту при испытаниях на клетках, что приводит к искажению результатов в *in vitro* исследованиях для таких соединений [Asiri *et al.* 2025].

Одним из эффективных подходов к повышению растворимости органических соединений в водных буферных системах состоит в применении производных циклодекстринов (ЦД) – циклических олигосахаридов, способных к образованию комплексов включения «гость–хозяин». Благодаря гидрофобной внутренней полости и гидрофильной внешней поверхности, незамещенные и химически модифицированные ЦД, такие как метилциклодекстрин (МЦД), амино-ЦД, глюко-ЦД и др. способны взаимодействовать с молекулами самой разной структуры, повышая их растворимость без использования инактивирующих органических соразтворителей [Kfoury, Fourmentin 2024].

В данной работе мы рассматриваем проблему растворимости органических молекул-ингибиторов на примере подавления активности флавин-зависимой L-галактон-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) – митохондриального мембранного фермента растительного происхождения, использующегося в качестве модели для изучения действия эффекторов (ингибиторов, электроноакцепторов) в отношении флавин-зависимых дегидрогеназ. Как показано в наших недавних исследованиях, AtGALDH может применяться как модельный фермент для поиска ингибиторов водонерастворимой галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* (TcGAL), вызывающей болезнь Шагаса [Chudin, Kudryashova 2022, 2023; Чудин, Кудряшова 2023, 2026].

TcGAL является облигаторно мембранным ферментом, катализирующим финальную стадию биосинтеза витамина С – антиоксиданта, который жизненно необходим микропаразиту. Однако *T. cruzi* не может поглощать этот витамин извне и поэтому синтезирует его самостоятельно. При этом фермент TcGAL отсутствует в организме человека и рассматривается нами как перспективная селективная лекарственная мишень. Как показано нами ранее, перспективной основной для лекарственных препаратов против трипаносомной инфекции являются натуральные терпеноиды и флавоноиды (аллилполиалкоксибензолы, АПАБ). Эти соединения представляют собой

природные компоненты экстрактов растительного сырья (например, *Petroselinum sativum Hoffm.* и *Anethum graveolens L.*) и обладают биологической активностью, в том числе противомикробной, противовоспалительной и др. [Tsyanov *et al.* 2022; Zlotnikov *et al.* 2022]. Например, диллапиол (главный компонент экстракта листьев *Piper aduncum*) демонстрирует антилейшманиозную активность с $IC_{50} = 60$ мкМ [Parise-Filho *et al.* 2012]. Можно предположить, что диллапиол и, возможно, другие АПАБ будут проявлять антитрипаносомную активность. Это согласуется с нашими исследованиями, согласно которым TcGAL эффективно ингибируется соединениями класса аллилполиалкоксибензолов (АПАБ) в относительно низких концентрациях (10-100 мкМ) [Чудин и др. 2023].

С применением методов компьютерного моделирования мы установили механизм ингибирования, показав, что крупные молекулы-ингибиторы, такие как ликорин, связываются с TcGAL вне активного центра, в то время как небольшие молекулы типа апиола могут связываться как внутри, так и вне активного центра [Shegolev *et al.* 2025]. Однако низкая растворимость АПАБ является фактором, ограничивающим ингибиторный анализ в экспериментальном исполнении.

Таким образом, целью данной работы являлась разработка подхода, основанного на применении комплексов включения ароматических молекул с МЦД, обеспечивающего повышение растворимости целевых соединений, для проведения ингибиторного анализа медицински значимых ферментов при изучении плохо растворимых ароматических соединений на примере AtGALDH. Это позволит установить их истинный ингибирующий эффект и оценить перспективы использования в качестве основы для антитрипаносомных препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. МЦД, ацетонитрил, компоненты фосфатных буферных растворов, 2,6-дихлорфенолиндофенол, L-галактоно-1,4-лактон – все производства Sigma-Aldrich (США), феназинметосульфат (Merck, Германия).

Методы. Рекомбинантную экспрессию L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* в *E. coli* проводили согласно методике, описанной ранее в работах [Leferink *et al.* 2008; Kudryashova *et al.* 2011]. АПАБ были получены согласно методикам, описанным в работе [Чудин и др. 2023].

Комплексы включения с МЦД (в мольном соотношении 1 : 10) готовили при смешивании 2 – 3 мг АПАБ и 10–30 мг МЦД с последующим суспендированием в 100–200 мкл ацетонитрила для смачивания (не растворения) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, после чего комплексы высушивали в потоке сухого воздуха или методом лиофилизации [Zlotnikov *et al.* 2024].

Изучение влияния АПАБ и их комплексов с МЦД на активность AtGALDH в водной среде (25 мМ фосфатный буфер с pH 8.8) проводили на спектрофотометре Ultrospec-2100 Amersham biosciences (США) с термостатируемым кюветным отделением (при 25°C), используя в качестве электроноакцептора феназинметосульфат (ФМС) в комбинации с 120 мкМ красителем 2,6-дихлорфенолиндофенолом (ДХФИФ) [Chudin, Kudryashova 2022] или отдельно 50 мкМ цитохрома *c* [Leferink *et al.* 2008]. Регистрацию активности проводили в кинетическом режиме в течение 1 минуты при длине волны 600 нм (характеристичная длина поглощения красителя ДХФИФ) в трёх повторях для каждого эксперимента.

Концентрация субстрата (L-галактоно-1,4-лактон) составляла 1 мМ, концентрация AtGALDH 6 нМ. Структуру частиц МЦД-АПАБ оценивали с помощью спектрофотометра Ultrospec-2100 pro («Amersham biosciences», США), ИК-микроскопа MICRAN-3 (Simex, Новосибирск, Россия) и атомно-

силового микроскопа NTEGRA II (NT-MDT Spectrum Instruments, Москва, Россия), концентрацию AtGALDH уточняли с помощью КД спектрометра Jasco J-815 (JASCO, Токио, Япония).

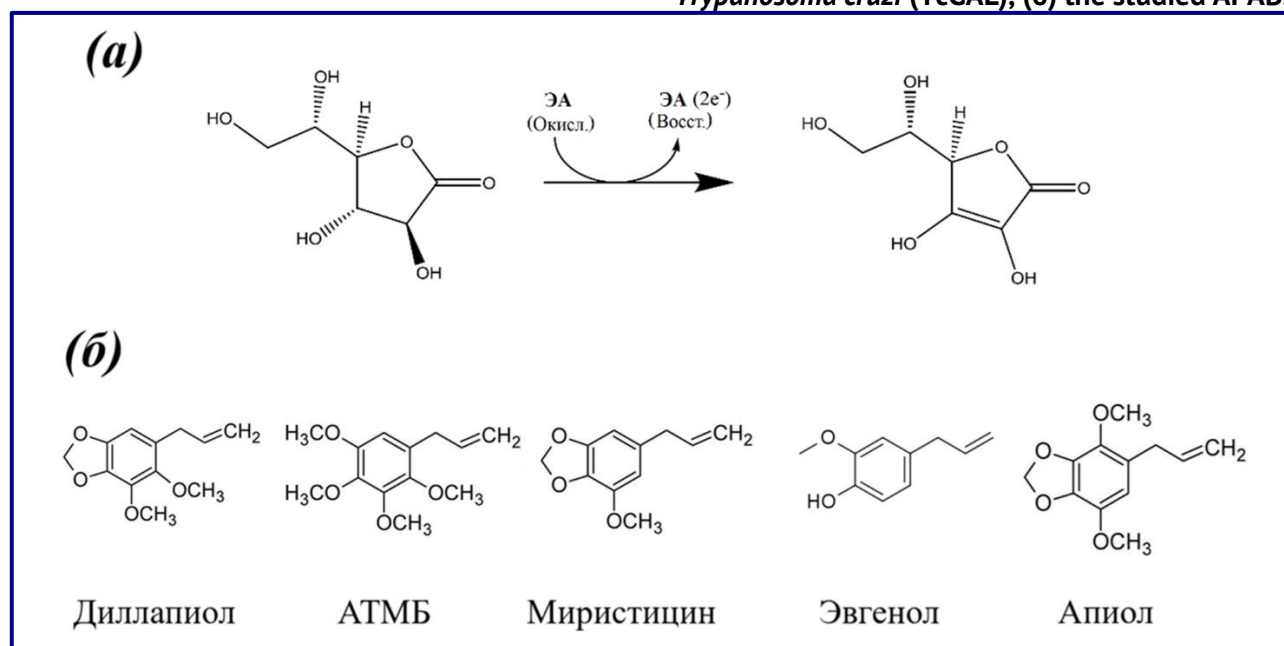
Регистрацию и обработку данных проводили при помощи программы Datalyse 3.70 (Carl Hemmingsen, Дания). Для статистической обработки данных использовали программу OriginPro (8, OriginLab Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

AtGALDH катализирует реакцию, аналогичную TcGAL, а именно: синтез витамина С из L-галактоно-1,4-лактона (рис. 1 (а)).

Рисунок 1. (а) – схема реакции, катализируемой AtGALDH и TcGAL, (б) – исследуемые АПАБ

Figure 1. (a) the scheme of the reaction catalyzed by AtGALDH and galactolactone oxidase from *Trypanosoma cruzi* (TcGAL), (б) the studied APABs



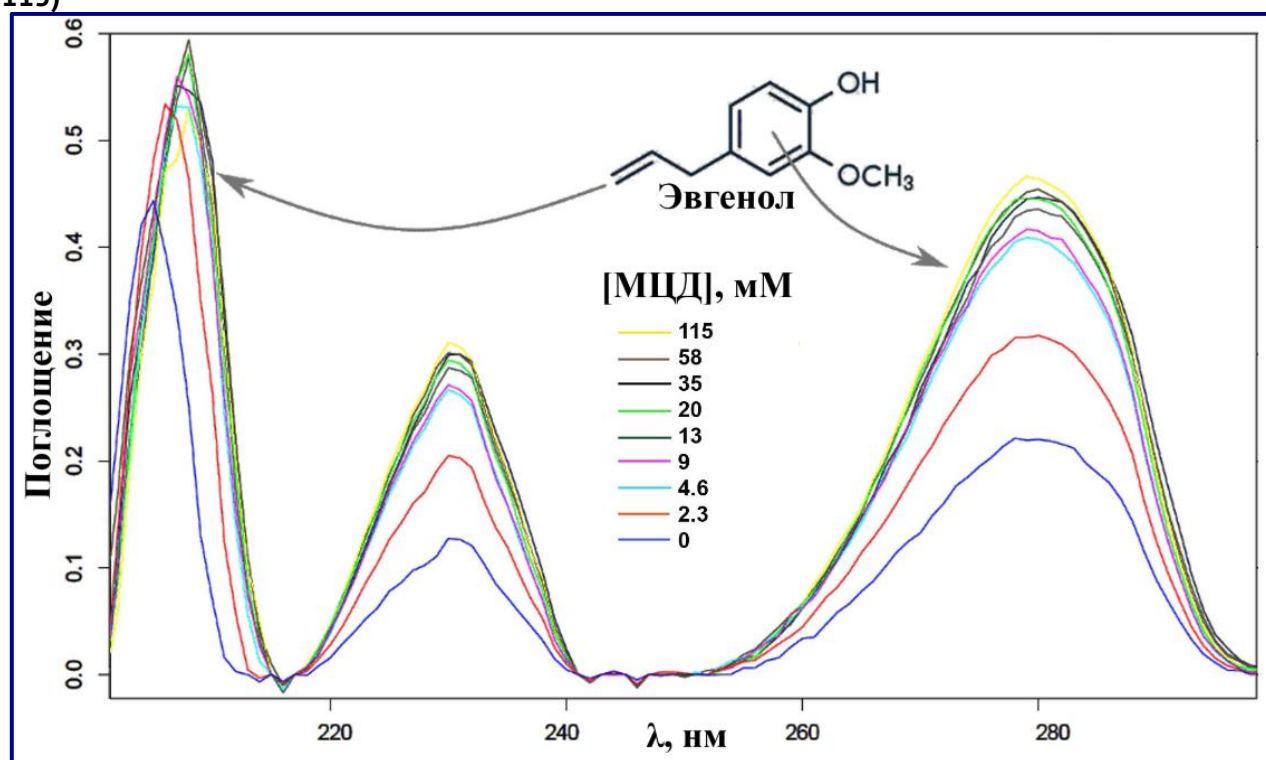
В настоящей работе мы проводили ингибиторный анализ AtGALDH, однако низкая растворимость исследуемых ингибиторов (АПАБ, рис. 1 (б)) затрудняет определение истинных значений определяемых их параметров (IC_{50} , максимальную степень ингибирования и др.). Ранее мы проводили ингибиторный анализ AtGALDH и TcGAL в системах обращённых мицелл, являющихся моделью мембран, где ароматические соединения, в том числе АПАБ, хорошо растворимы [Чудин и др. 2023]. Однако использование мицелл, несмотря на целесообразность такого подхода для мембранного TcGAL, усложняет схему ингибиторного анализа. Поэтому в случае водорастворимого AtGALDH предпочтительно проводить анализ в водной среде, а для улучшения растворимости АПАБ использовать подход, основанный на образовании комплексов с производными циклодекстринов (МЦД).

Согласно нашим исследованиям, АПАБ способны формировать комплексы включения типа «гость-хозяин» с МЦД при смешивании в молярном соотношении 1 : 10 с последующим суспендированием в ацетонитриле, инкубацией в течение 1 ч при 37°C и сушки в потоке сухого воздуха или методом лиофилизации [Zlotnikov *et al.* 2022]. При этом растворимость комплексов АПАБ-МЦД по сравнению с исходными АПАБ возрастает до 200-500 раз [Zlotnikov *et al.* 2022]. Формирование самих комплексов было подтверждено методом ИК-спектроскопии: значения констант диссоциации K_D комплексов АПАБ с МЦД лежат в диапазоне 10^{-3} – 10^{-4} М [Zlotnikov *et al.*

2023, 2024]. В данной работе в качестве контроля образования комплексов использовали метод УФ-спектроскопии: на рис. 2 показан пример для эвгенола, где наблюдается увеличение интенсивности максимума поглощения при длине волны 280 нм и батохромный сдвиг максимума поглощения эвгенола (относительно 205 нм) в длинноволновую область, обусловленный снижением энергии электронных переходов (типа $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$) аллильной группы при ее попадании в гидрофобную полость циклодекстрина по сравнению с водным раствором.

Рисунок 2. УФ-спектры эвгенола (нижний спектр тёмно-синего цвета) и эвгенола с МЦД с различным молярным соотношением (от 2.3 до 115)

Figure 2. UV spectra of eugenol (dark blue, lower spectrum) and of eugenol in the presence of MCD at different molar ratios (from 2.3 to 115)

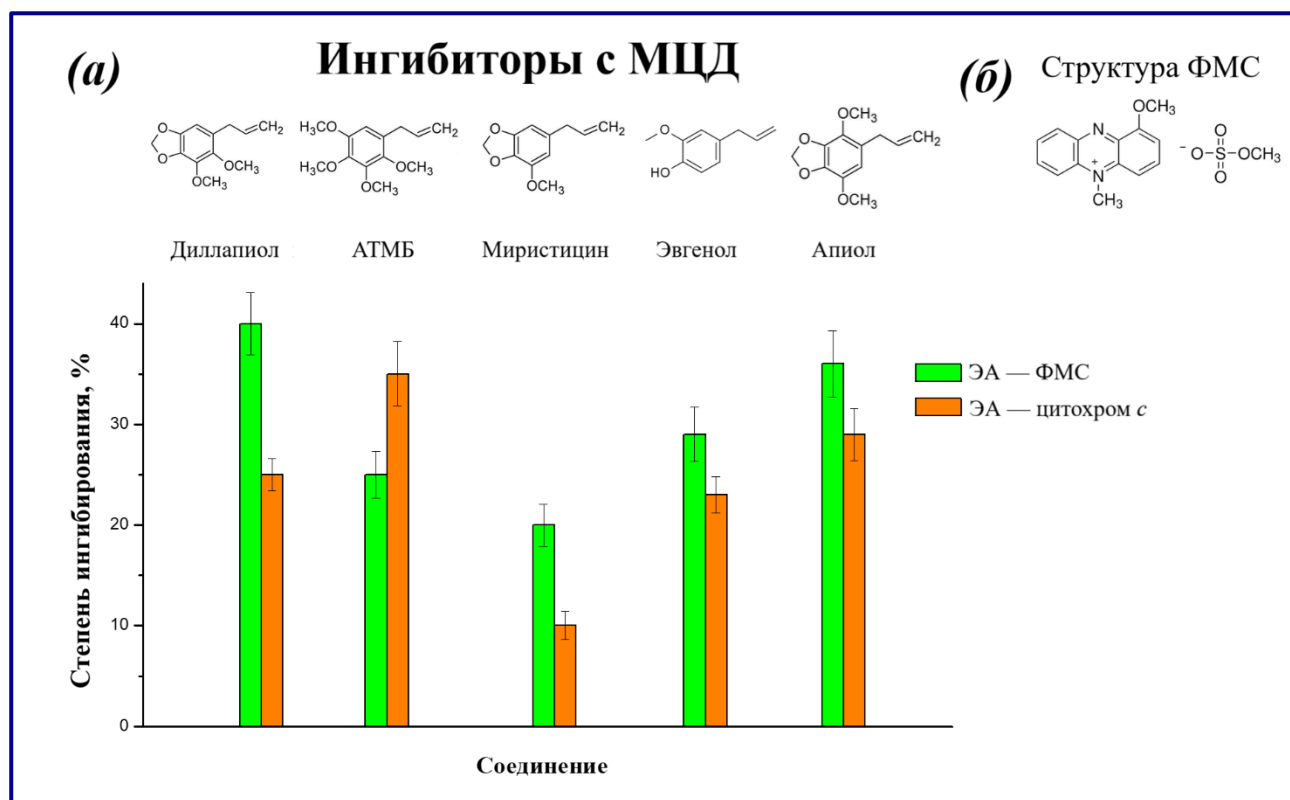


Аналогичные изменения в УФ-спектрах наблюдали и для остальных АПАБ при взаимодействии с МЦД. Описанные выше изменения соответствуют таковым для комплекса 2-гидроксипропил-циклодекстрина с терпеноидами, описанные ранее в нашей работе [Zlotnikov *et al.* 2022], что подтверждает образование комплекса.

Для определения влияния МЦД на растворимость АПАБ и их ингибирующие свойства в отношении AtGALDH проводили две серии экспериментов: для АПАБ и для комплексов АПАБ с МЦД. Дополнительно для оценки влияния природы используемого электроноакцептора (ЭА, второго субстрата в реакции) на эффективность ингибирования проводили ингибиторный анализ с двумя видами ЭА: природным белковым ЭА (цитохром *c*) и синтетическим низкомолекулярным ЭА (ФМС, рис. 3 (б)). Тип ЭА (природный белок или синтетическое низкомолекулярное соединение) играет важную роль, поскольку цитохром *c* – специфический ЭА, который образует переходный комплекс с ферментом перед этапом переноса электронов [Hervás *et al.* 2013]. В отличие от него, ФМС представляет собой синтетическое низкомолекулярное соединение, используемое в качестве искусственного акцептора электронов. ФМС не требует формирования специфического белок-белкового комплекса с ферментом и поэтому может быть удобен для проведения стандартизированного ферментного анализа. Кроме того, ФМС более устойчив в различных средах. Результаты по ингибированию AtGALDH комплексами АПАБ с МЦД представлены на рис. 3 (а).

Рисунок 3. (а) – Степень ингибирования (%) AtGALDH комплексами АПАБ с МЦД, (б) – структурная формула ФМС

Figure 3. (a) AtGALDH inhibition (%) by APAB-MCD complexes; (б) structural formula of phenazine methosulfate (PMS)



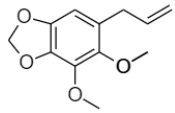
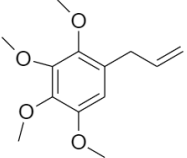
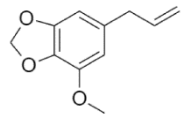
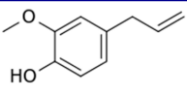
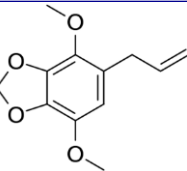
Примечание. (а) – слева направо: диллапиол, аллилтетраметоксибензол (АТМБ), миристицин, эвгенол и апиол ($M \pm SD$, $n=3$). Зелёным цветом выделены эксперименты с использованием искусственного ЭА (ФМС), оранжевым цветом – с использованием природного ЭА (цитохром с) в водном растворе (0.25 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8.8). Концентрации: субстрат – 1 мМ, ФМС – 120 мкМ, ДХФИФ – 120 мкМ, цитохром с – 50 мкМ, комплексы АПАБ-МЦД (диллапиол-МЦД, АТМБ-МЦД, миристицин-МЦД, эвгенол-МЦД, апиол-МЦД) – каждый комплекс по 500 мкМ, AtGALDH – 6 нМ соответственно, (б) – структурная формула ФМС

Note. (a) – from left to right: dillapiol, allyltetramethoxybenzene (ATMB), myristicin, eugenol and apiole ($M \pm SD$, $n=3$). Experiments using artificial EA (PMS) are highlighted in green, and experiments using natural EA (cytochrome c) in an aqueous solution (0.25 mM sodium phosphate buffer, pH 8.8) are highlighted in orange. Concentrations: substrate = 1 mM, PMS = 120 μ M, DCPIP = 120 μ M, cytochrome c = 50 μ M, APAB-MCD complexes (dillapiol-MCD, ATMB-MCD, myristicin-MCD, eugenol-MCD, apiole-MCD) – each complex at 500 μ M, AtGALDH = 6 nM, respectively, (б) – structural formula of PMS

В каждом эксперименте с АПАБ (без МЦД) исходную концентрацию каждого соединения устанавливали на уровне 0.5 мМ, независимо от индивидуальной растворимости веществ. Для расчёта истинных концентраций используемых АПАБ (без МЦД) мы использовали данные о растворимости АПАБ из нашей работы [Zlotnikov *et al.* 2022] (табл. 1).

Соединения АПАБ без МЦД фактически не ингибируют AtGALDH даже при максимально возможных концентрациях (истинные концентрации и растворимости указаны в подписи к рис. 3 (а) и в табл. 1). При этом в мицеллярной среде эффективность этих ингибиторов была гораздо выше (ингибирование до 85-90%) [Чудин *и др.* 2023], что, по всей видимости, связано с их более высокой растворимостью в мицеллярной среде по сравнению с водной тест-системой.

Таблица 1. Растворимость АПАБ и их комплексов с МЦД в водной среде (фосфатный буфер, pH 6.2) согласно данным [Zlotnikov *et al.* 2022]**Table 1. Solubility of APABs and their complexes with MCD in an aqueous medium (phosphate buffer, pH 6.2) according to [Zlotnikov *et al.* 2022]**

Соединение	Структура	Растворимость в водной среде, мМ	Растворимость комплекса с МЦД в водной среде, мМ
Диллапиол		0.24 ± 0.05	4.5 ± 0.07
АТМБ		0.16 ± 0.02	2.8 ± 0.4
Миристицин		0.030 ± 0.007	15 ± 1
Эвгенол		0.82 ± 0.2	11 ± 1
Апиол		0.13 ± 0.01	2.6 ± 0.3

В случае же комплексов АПАБ с МЦД, повышающим растворимость АПАБ в 200-500 раз, эффективность ингибирования в водной среде увеличилась до 35–40% (рис. 3 (а)). Повышение ингибирующего эффекта коррелирует с увеличением растворимости АПАБ при использовании комплексов с МЦД. Это объясняется солюбилизирующим действием МЦД в отношении АПАБ [Zlotnikov *et al.* 2022].

Таким образом, обнаружено, что ингибирующий эффект возрастает у всех без исключения исследуемых АПАБ при использовании комплексов АПАБ-МЦД, что связано с гораздо более высокой растворимостью последних (до 200-500 раз выше, чем у исходных АПАБ [Zlotnikov *et al.* 2022]). При этом сам МЦД в концентрации 0.5 мМ не оказывает влияние на активность AtGALDH.

Установив истинные параметры ингибирования для соединений АПАБ (с учётом реальных концентраций АПАБ, рассчитанных согласно таблице 1), следует отдельно обсудить влияние структур этих ингибиторов на их эффективность. Так, миристицин и эвгенол, содержащие только одну метокси-группу, ингибируют AtGALDH в меньшей степени по сравнению с соединениями, обладающими несколькими ОСН₃-группами: диллапиолом, апиолом (содержат по 2 метокси-группы) и АТМБ (4 метокси-группы). При этом у АТМБ, обладающего 4-мя ОСН₃-группами, нет существенного преимущества по сравнению с «диметокси»-соединениями (апиолом и диллапиолом). По-видимому, метокси-группы, их число и пространственное расположение вносят значимый вклад в ингибирование, проявляя синергию в количестве двух и более.

Кроме того, отметим, что каких-либо закономерностей в плане эффективности ингибирования в зависимости от природы используемого ЭА (белковый цитохром с или искусственный ФМС) не наблюдается – для некоторых АПАБ ингибирование немного больше при использовании природного ЭА, для других – при использовании искусственного ЭА, однако отличия не являются статистически значимыми (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы продемонстрировали улучшение ингибирующей способности (в отношении AtGALDH) ряда соединений АПАБ за счёт повышения их растворимости при образовании комплексов включения с МЦД. Полученные результаты согласуются с приведёнными в литературе данными по повышению растворимости и, как следствие, эффективности ингибиторов в отношении самой *T. cruzi*, вызывающей болезнь Шагаса, и для изучаемого модельного фермента-мишени AtGALDH. Так, комплекс О-аллил-лавсон с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином обладает $IC_{50} = 0.5$ мкМ, в то время как исходный О-аллил-лавсон имеет $IC_{50} = 97$ мкМ, то есть комплекс в *in vitro* исследовании эффективнее чем исходный ингибитор более, чем в 190 раз [Nicoletti *et al.* 2023]. По величине IC_{50} комплекс также превосходил традиционный антитрипаносомный препарат бензнидазол, для которого в сопоставимых условиях было получено значение 105 мкМ. Учитывая, что некоторые из рассматриваемых нами АПАБ обладают антитрипаносомной активностью (например, эвгенол [Carvalho *et al.* 2023]), можно предположить, что комплексообразование с МЦД усилит ингибирующей эффект АПАБ не только в отношении модельного AtGALDH, но и самой *T. cruzi*.

Другим интересным примером является 3a,10b-дигидро-1H-циклопента[b]нафто[2,3-d]фуран-5,10-дион (IVS320) – нафтохинон, обладающий противогрибковой и противотрипаносомной активностями, но характеризующийся низкой растворимостью в воде. Используя комплексы данного соединения с циклодекстрином и МЦД, авторы продемонстрировали значительное усиление эффективности IVS320 *in vitro*, в том числе его противотрипаносомной активности (с 48 до 72%), которой обладают и некоторые из изучаемых АПАБ.

Следует отметить, что комплексы многих ингибиторов с ЦД и его производными не только имеют лучшую растворимость, но и обладают повышенной мембранной проницаемостью. Так, комплексообразование флавоноида кемпферола (компонент БАДов и лекарств) с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином приводит к увеличению водорастворимости исходного флавоноида в 5.45 раза и улучшению кажущейся проницаемости в 2.5 раза по сравнению с чистым кемпферолом [Sahani *et al.* 2026]. Другим интересным примером являются комплексы гесперидина и куркумина с МЦД и гидроксипропил- β -циклодекстрином – авторы не только демонстрируют, что комплексообразование с производным циклодекстрина повышает проникновение флавоноидов в мембраны, но и предлагают свой подход к прогнозированию проницаемости *in vivo* на основе экспериментов *in vitro* [Squizzato *et al.* 2025]. Отметим, что эффективная мембранная проницаемость важна для оценки активности в отношении внутриклеточных мишеней (в том числе AtGALDH и целевого TcGAL), где эффективная концентрация вещества внутри клетки зависит не только от его растворимости во внешней среде, но и от способности преодолевать мембранные барьеры.

Согласно нашим данным, АПАБ ингибируют TcGAL, гомологичный AtGALDH (общие остатки в активном центре и высокая гомология вблизи него), в мицеллярной среде с той же эффективностью (процент ингибирования 85–95%) [Чудин *и др.* 2023], что и комплексы АПАБ-МЦД в отношении изучаемого AtGALDH в водной среде в настоящей работе.

В целом, полученные результаты демонстрируют, что представленный подход (формирование комплексов с МЦД) является перспективным и действенным приёмом для проведения скрининга нерастворимых в водных тест-системах ингибиторов медицински значимых ферментов.

ВЫВОДЫ

Разработан подход к проведению ингибиторного анализа плохо растворимых ароматических соединений на основе их комплексов включения с метил- β -циклодекстрином.

На примере аллилполиалкоксибензолов (терпеноидов и флавоноидов) показано, что комплексообразование с МЦД повышает их доступность в водной реакционной среде и сопровождается увеличением ингибирующей активности в отношении AtGALDH.

При комплексообразовании с МЦД относительное соотношение ингибирующей активности исследованных АПАБ практически не изменялось, что позволяет использовать данный подход для их сравнительного анализа.

Комплексы АПАБ–МЦД могут применяться для скрининга гидрофобных ингибиторов в водных ферментных тест-системах, в которых непосредственное исследование свободных соединений ограничено их низкой растворимостью.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования комплексов включения с МЦД для целенаправленного поиска лекарственной основы против трипаносомной и других инфекций. При этом подтверждение противопаразитарной активности соединений требует дополнительных исследований в клеточных и доклинических моделях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования: ИК-микроскоп MICRAN-3 (Simex, Новосибирск, Россия), КД-спектрометр Jasco J-815 (JASCO, Токио, Япония) и атомно-силовой микроскоп NTEGRA II (NT-MDT Spectrum Instruments, Москва, Россия) по программе развития МГУ.

Конфликт интересов | Conflicts of Interest

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. The authors declare no actual or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Чудин А.А., Злотников И.Д., Крылов С.С., Семенов В.В., Кудряшова Е.В. (2023) Ингибиторы галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* на основе аллилполиалкоксибензолов. *Биохимия*. **88**(1): 97–109. <https://doi.org/10.31857/S0320972523010074> EDN: PCFZWJ
- Чудин А.А., Кудряшова Е.В. (2023) 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. *Биохимия*. **88**(12): 2457–2468. <https://doi.org/10.31857/S0320972523120096> EDN: NLBOGA
- Чудин А.А., Кудряшова Е.В. (2026) Медицински значимые флавин-зависимые оксидазы и дегидрогеназы и новые возможности их исследования с использованием алгоритмов искусственного интеллекта. *Биоорганическая химия*. **52**. (в печати)
- Asiri A., Tasleem M., Al Said M., Asiri A., Al Qarni A.A., Bakillah A. (2025) Optimizing cell density and unveiling cytotoxic profiles of DMSO and ethanol in six cancer cell lines: Experimental and *in silico* insights. *Methods and Protocols*. **8**(4): 93. <https://doi.org/10.3390/mps8040093> EDN: WLZTOF
- Carvalho D.T., Teixeira M., Luelmo S., Santarém N., Pinto E., Cordeiro-da-Silva A., Sousa E. (2023) Synthesis and evaluation of marine-inspired compounds result in hybrids with antitrypanosomal and antileishmanial activities. *Marine Drugs*. **21**(11): 551. <https://doi.org/10.3390/md21110551> EDN: UGSGLF
- Chudin A.A., Kudryashova E.V. (2022) Improved enzymatic assay and inhibition analysis of redox membranotropic enzymes, AtGALDH and TcGAL, using a reversed micellar system. *Analytica*. **3**(1): 36–53. <https://doi.org/10.3390/analytica3010004> EDN: NHZKPG
- Chudin A.A., Kudryashova E.V. (2023) Flavin-dependent dehydrogenases and oxidases: Comparison of structural functional properties (a review). *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. **49**(6): 1229–1242. <https://doi.org/10.1134/S1068162023060055> EDN: VLJSWO

- Doukyu N., Ogino H. (2010) Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*. **48**(3): 270–282. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.09.009> EDN: XXFSIV
- Fan D., Wang B., Stelitano G., Savková K., Riabova O., Shi R., Wu X., Chiarelli L.R., Mikušová K., Makarov V. *et al.* (2023) Side chain-modified benzothiazinone derivatives with anti-mycobacterial activity. *Biomedicines*. **11**(7): 1975. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071975> EDN: APHFXM
- Hervás M., Bashir Q., Leferink N.G.H., Ferreira P., Moreno-Beltrán B., Westphal A.H., Díaz-Moreno I., Medina M., de la Rosa M.A., Ubbink M. *et al.* (2013) Communication between L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase and cytochrome c. *The FEBS Journal*. **280**(8): 1830–1840. <https://doi.org/10.1111/febs.12207>
- Kfoury M., Fourmentin S. (2024) State of the art in cyclodextrin solubility enhancement. Are green solvents the solution? *Journal of Molecular Liquids*. **410**: 125599. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.125599> EDN: RLNGUD
- Kudryashova E. V., Leferink N.G.H., Slot I.G.M., van Berkel W.J.H. (2011) Galactonolactone oxidoreductase from *Trypanosoma cruzi* employs a FAD cofactor for the synthesis of vitamin C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. **1814**(5): 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.03.001> EDN: OHYXUV
- Leferink N.G.H., van den Berg W.A.M., van Berkel W.J.H. (2008) L-Galactono-γ-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *The FEBS Journal*. **275**(4): 713–726. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06233.x>
- Nicoletti C.D., dos Santos Galvão R.M., de Sá Haddad Queiroz M., Barbocher L., Faria A.F.M., Teixeira G.P., Souza A.L.A., de Carvalho da Silva F., Ferreira V.F., da Silva Lima C.H. *et al.* (2023) Inclusion complex of O-allyl-lawsone with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin: Preparation, physical characterization, antiparasitic and antifungal activity. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. **55**(3): 233–248. <https://doi.org/10.1007/s10863-023-09970-x> EDN: PXDDTR
- 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. *et al.* (2012) Dillapiol as antileishmanial agent: Discovery, cytotoxic activity and preliminary SAR studies of dillapiol analogues. *Archiv der Pharmazie*. **345**(12): 934–944. <https://doi.org/10.1002/ardp.201200212>
- Sahani V., Patil S., Mahato A., Kumar M., Shanthi C.N. (2026) Molecular docking and physicochemical characterisation of kaempferol-hydroxy propyl-β-cyclodextrin-Inclusion complex. *Chemical Physics Impact*. **12**: 101017. <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2026.101017> EDN: QTFSVD
- Squizzato M., Agosta F., Ciancetta A., Grassi M., Cortesi R., di Cagno M.P. (2025) Supramolecular delivery systems for polyphenols: A green approach to predict *in vivo* permeability through an *in vitro* setup. *International Journal of Pharmaceutics*. **670**: 125170. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2025.125170> EDN: BOHWYS
- Shegolev V.O., Veselovsky A.V., Kudryashova E.V. (2025) Structural modeling of L-galactonolactone dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Mendeleev Communications*. **35**(2): 133–135. <https://doi.org/10.71267/mencom.7590> EDN: MAJUNS
- Spiewok S., Schaefer M., Lamla M., Jaritz Y., Kuehne A.J.C. (2025) Oligoethylene phosphoramidate-based kinase inhibitor prodrugs—solubility, enzyme inhibition, and hydrolysis. *Chemistry – A European Journal*. **31**(12). <https://doi.org/10.1002/chem.202404618> EDN: RYXNTG
- 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. *et al.* (2022) Synthesis and antiproliferative activity of triphenylphosphonium derivatives of natural allylpolyalkoxybenzenes. *ACS Omega*. **7**(4): 3369–3383. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05515> EDN: MXFPTU
- Zlotnikov I.D., Belogurova N.G., Krylov S.S., Semenova M.N., Semenov V.V., Kudryashova E.V. (2022) Plant alkylbenzenes and terpenoids in the form of cyclodextrin inclusion complexes as antibacterial agents and levofloxacin synergists. *Pharmaceutics*. **15**(7): 861. <https://doi.org/10.3390/ph15070861> EDN: ROIXOF
- Zlotnikov I.D., Davydova M.P., Danilov M.R., Krylov S.S., Belogurova N.G., Kudryashova E.V. (2023) Covalent conjugates of allylbenzenes and terpenoids as antibiotics enhancers with the function of prolonged action. *Pharmaceutics*. **16**(8): 1102. <https://doi.org/10.3390/ph16081102> EDN: RDCIFY
- Zlotnikov I.D., Krylov S.S., Belogurova N.G., Blinnikov A.N., Kalugin V.E., Kudryashova E.V. (2024) New derivatives of chalcones, chromenes, and stilbenoids, complexed with methyl-β-cyclodextrin with antioxidant properties and antibacterial synergism with antibiotics. *Biophysica*. **4**(4): 667–694. <https://doi.org/10.3390/biophysica4040044> EDN: MSNUKG

REFERENCES

- Chudin A.A., Zlotnikov I.D., Krylov S.S., Semenov V.V., Kudryashova E.V. (2023) Inhibitors of galactonolactone oxidase from *Trypanosoma cruzi* based on allylpolyalkoxybenzenes. *Biochemistry*. **88**(1): 97–109. <https://doi.org/10.31857/S0320972523010074> EDN: PCFZWJ (in Russian)
- Chudin A.A., Kudryashova E.V. (2023) Impact of lipid matrix composition on the 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. *Biochemistry*. **88**(12): 2457–2468. <https://doi.org/10.31857/S0320972523120096> EDN: NLBOGA (in Russian)
- Chudin A.A., Kudryashova E.V. (2026) Flavin-dependent oxidases and dehydrogenases of medical importance and new opportunities for their research using artificial intelligence algorithms. *Bioorganic chemistry*. **52** (in press) (in Russian)
- Asiri A., Tasleem M., Al Said M., Asiri A., Al Qarni A.A., Bakillah A. (2025) Optimizing cell density and unveiling cytotoxic profiles of DMSO and ethanol in six cancer cell lines: Experimental and *in silico* insights. *Methods and Protocols*. **8**(4): 93. <https://doi.org/10.3390/mps8040093> EDN: WLZTOF
- Carvalho D.T., Teixeira M., Luelmo S., Santarém N., Pinto E., Cordeiro-da-Silva A., Sousa E. (2023) Synthesis and evaluation of marine-inspired compounds result in hybrids with antitrypanosomal and antileishmanial activities. *Marine Drugs*. **21**(11): 551. <https://doi.org/10.3390/md21110551> EDN: UGSGLF
- Chudin A.A., Kudryashova E.V. (2022) Improved enzymatic assay and inhibition analysis of redox membranotropic enzymes, AtGALDH and TcGAL, using a reversed micellar system. *Analytica*. **3**(1): 36–53. <https://doi.org/10.3390/analytica3010004> EDN: NHZKPG
- Chudin A.A., Kudryashova E.V. (2023) Flavin-dependent dehydrogenases and oxidases: Comparison of structural functional properties (a review). *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. **49**(6): 1229–1242. <https://doi.org/10.1134/S1068162023060055> EDN: VLJSWO
- Doukyu N., Ogino H. (2010) Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*. **48**(3): 270–282. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.09.009> EDN: XXFSIV
- Fan D., Wang B., Stelitano G., Savková K., Riabova O., Shi R., Wu X., Chiarelli L.R., Mikušová K., Makarov V. *et al.* (2023) Side chain-modified benzothiazinone derivatives with anti-mycobacterial activity. *Biomedicines*. **11**(7): 1975. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071975> EDN: APHF XM
- Hervás M., Bashir Q., Leferink N.G.H., Ferreira P., Moreno-Beltrán B., Westphal A.H., Díaz-Moreno I., Medina M., de la Rosa M.A., Ubbink M. *et al.* (2013) Communication between L–galactono–1,4–lactone dehydrogenase and cytochrome *c*. *The FEBS Journal*. **280**(8): 1830–1840. <https://doi.org/10.1111/febs.12207>
- Kfoury M., Fourmentin S. (2024) State of the art in cyclodextrin solubility enhancement. Are green solvents the solution? *Journal of Molecular Liquids*. **410**: 125599. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.125599> EDN: RLNGUD
- Kudryashova E. V., Leferink N.G.H., Slot I.G.M., van Berkel W.J.H. (2011) Galactonolactone oxidoreductase from *Trypanosoma cruzi* employs a FAD cofactor for the synthesis of vitamin C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. **1814**(5): 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.03.001> EDN: OHYXUV
- Leferink N.G.H., van den Berg W.A.M., van Berkel W.J.H. (2008) L-Galactono-γ-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *The FEBS Journal*. **275**(4): 713–726. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06233.x>
- Nicoletti C.D., dos Santos Galvão R.M., de Sá Haddad Queiroz M., Barbocher L., Faria A.F.M., Teixeira G.P., Souza A.L.A., de Carvalho da Silva F., Ferreira V.F., da Silva Lima C.H. *et al.* (2023) Inclusion complex of O-allyl-lawsone with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin: Preparation, physical characterization, antiparasitic and antifungal activity. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. **55**(3): 233–248. <https://doi.org/10.1007/s10863-023-09970-x> EDN: PXDDTR
- 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. *et al.* (2012) Dillapiol as antileishmanial agent: Discovery, cytotoxic activity and preliminary SAR studies of dillapiol analogues. *Archiv der Pharmazie*. **345**(12): 934–944. <https://doi.org/10.1002/ardp.201200212>
- Sahani V., Patil S., Mahato A., Kumar M., Shanthi C.N. (2026) Molecular docking and physicochemical characterisation of kaempferol-hydroxy propyl-β-cyclodextrin-Inclusion complex. *Chemical Physics Impact*. **12**: 101017. <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2026.101017> EDN: QTFSVD

- Sguizzato M., Agosta F., Ciancetta A., Grassi M., Cortesi R., di Cagno M.P. (2025) Supramolecular delivery systems for polyphenols: A green approach to predict *in vivo* permeability through an *in vitro* setup. *International Journal of Pharmaceutics*. **670**: 125170. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2025.125170> EDN: BOHWYS
- Shegolev V.O., Veselovsky A.V., Kudryashova E.V. (2025) Structural modeling of L-galactonolactone dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Mendeleev Communications*. **35**(2): 133–135. <https://doi.org/10.71267/mencom.7590> EDN: MAJUNS
- Spiewok S., Schaefer M., Lamla M., Jaritz Y., Kuehne A.J.C. (2025) Oligoethylene phosphoramidate-based kinase inhibitor prodrugs—solubility, enzyme inhibition, and hydrolysis. *Chemistry – A European Journal*. **31**(12). <https://doi.org/10.1002/chem.202404618> EDN: RYXNTG
- 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. *et al.* (2022) Synthesis and antiproliferative activity of triphenylphosphonium derivatives of natural allylpolyalkoxybenzenes. *ACS Omega*. **7**(4): 3369–3383. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05515> EDN: MXFPTU
- Zlotnikov I.D., Belogurova N.G., Krylov S.S., Semenova M.N., Semenov V.V., Kudryashova E.V. (2022) Plant alkylbenzenes and terpenoids in the form of cyclodextrin inclusion complexes as antibacterial agents and levofloxacin synergists. *Pharmaceutics*. **15**(7): 861. <https://doi.org/10.3390/ph15070861> EDN: ROIXOF
- Zlotnikov I.D., Davydova M.P., Danilov M.R., Krylov S.S., Belogurova N.G., Kudryashova E.V. (2023) Covalent conjugates of allylbenzenes and terpenoids as antibiotics enhancers with the function of prolonged action. *Pharmaceutics*. **16**(8): 1102. <https://doi.org/10.3390/ph16081102> EDN: RDCIFY
- Zlotnikov I.D., Krylov S.S., Belogurova N.G., Blinnikov A.N., Kalugin V.E., Kudryashova E.V. (2024) New derivatives of chalcones, chromenes, and stilbenoids, complexed with methyl- β -cyclodextrin with antioxidant properties and antibacterial synergism with antibiotics. *Biophysica*. **4**(4): 667–694. <https://doi.org/10.3390/biophysica4040044> EDN: MSNUKG

Цитировать как

Чудин А.А., Кудряшова Е.В. (2026). Применение производных циклодекстринов для проведения скрининга нерастворимых ингибиторов медицински значимых ферментов на примере L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana*. *Экобиотех.* **9**(3): 447–458.
DOI: <http://doi.org/10.31163/2618-964X/2026-34>
EDN: <https://www.elibrary.ru/xzlyqb>

Cited as

Chudin A.A., Kudryashova E.V. (2026). Application of cyclodextrins derivatives to *in vitro* screening of insoluble inhibitors of clinically relevant enzymes using L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* as example. *Ecobiotech*. **9**(3): 447–458.
DOI: <http://doi.org/10.31163/2618-964X/2026-34>
EDN: <https://www.elibrary.ru/xzlyqb>

Сведения об авторах

Андрей Алексеевич Чудин, к.х.н., Центральный университет, Москва, Россия. E-mail: andrew_18@inbox.ru, SPIN-код: 6537-3709, ORCID: 0009-0000-9271-5772, Scopus Author ID: 58107720900, WoS Research ID: KVB-4320-2024.

Елена Вадимовна Кудряшова, д.х.н., проф. Центральный университет, Москва, Россия. E-mail: helenakoudriachova@yandex.ru, SPIN-код: 5483-4291, ORCID: 0000-0002-9761-7757, Scopus Author ID: 35585459100, WoS Research ID: AAD-1171-2022.

Information About the Author(s)

Andrei Alekseevich Chudin, PhD in Chemical Science, Central University, Moscow, Russia. E-mail: andrew_18@inbox.ru, SPIN-код: 6537-3709, ORCID: 0009-0000-9271-5772, Scopus Author ID: 58107720900, WoS Research ID: KVB-4320-2024.

Elena Vadimovna Kudryashova, Doctor in Chemical Science, Professor Central University, Moscow, Russia. E-mail: helenakoudriachova@yandex.ru, SPIN-код: 5483-4291, ORCID: 0000-0002-9761-7757, Scopus Author ID: 35585459100, WoS Research ID: AAD-1171-2022.