

©Коллектив авторов

IN SILICO МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОНЬЮГАТОВ ИЗОНИАЗИД-СТЕРОИД С ЦИТОХРОМАМИ P450 МИКОБАКТЕРИЙ И ИХ ПРЕВРАЩЕНИЕ IN VITRO В КЛЕТКАХ ДАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Я.В. Фалетров^{1,2}, К.А. Гилев¹, А.С. Фальчевская¹, М.С. Хорецкий^{1,2}, Я.В. Панада^{1,2},
Е.В. Андриевская¹, Е.В. Рудая², Н.С. Фролова², А. Бжостек³, Р. Плоцинска³, В.М. Шкуматов^{1,2*}

¹Химический факультет, Белорусский государственный университет,
ул. Ленинградская, 14, Минск, 220030 Беларусь

²Научно-исследовательский институт физико-химических проблем, Белорусский государственный университет,
ул. Ленинградская, 14, Минск, 220030 Беларусь; *эл. почта: biopharm@bsu.by

³Institute for Medical Biology, Polish Academy of Sciences, 106 Lodowa str., 93-232, Lodz, Poland

Проведён докинг гидразонов изониазида, включая стероиды дегидроэпиандростерон, прегненолон, 16 α ,17 α -эпокипрегненолон и холестенон (IDHEA, IPRE, IEP5, ICHN), по отношению к цитохромам P450 (CYP) микобактерий. Установлено *in silico*, что эти гидразоны могут эффективно связываться с CYP121, CYP124, CYP125, CYP126A1, CYP130 и CYP51 с расчётными энергиями связывания от -9 ккал/моль до -12 ккал/моль. При моделировании пассивной диффузии через липидный бислой показана повышенная проницаемость конъюгатов через липидные мембраны по сравнению с самим изониазидом. В эксперименте *in vitro* определено, что вещества IDHEA, IPRE, IEP5 способны превращаться в соответствующие 3-кето-4-еновые производные, что указывает на их способность проникать в клетки микобактерий *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Полученные данные вносят вклад в понимание специфичности связывания искусственных производных стероидов с CYP микобактерий и свидетельствуют о возможности использования изученных нами стероидных соединений в качестве новых лигандов для этих ферментов.

Ключевые слова: изониазид; стероиды; конъюгаты; молекулярный докинг; микобактерии; цитохромы P450

DOI: 10.18097/PBMC20206605378

ВВЕДЕНИЕ

Микобактерии *Mycobacterium tuberculosis* являются возбудителями туберкулёза — одного из самых смертоносных инфекционных заболеваний, уносящего жизни более миллиона людей ежегодно [1]. Возникновение резистентности к применяемым в настоящее время лекарствам у *M. tuberculosis* стимулирует исследования по созданию новых противотуберкулёзных лекарств [2]. Изониазид (гидразид 4-пиридинкарбоновой кислоты) является одним из первых антитуберкулёзных лекарственных веществ и используется как лекарство до сих пор. В связи с этим проводятся исследования по дизайну его улучшенных аналогов, в частности, направленные на получение его более липофильных производных с улучшенной способностью проникать через липидные мембраны микобактерий [3, 4]. С другой стороны, способность микобактерий поглощать и превращать холестерин и некоторые другие стероиды в ряд продуктов окисления стероидного ядра и боковой цепи представляет интерес для разработки веществ с антимикобактериальной активностью в связи с появлением сообщений о важной роли этих превращений и осуществляющих их белков в вирулентности и выживаемости этих микроорганизмов [5, 6]. В частности, в таких превращениях могут принимать участие цитохромы P450 (CYP) CYP121A1, CYP125A1, CYP139A1, CYP142A1 и CYP143A1 [7], а также 3-кетостероид-1-дегидрогеназы [8] и 3-кетостероид-9 α -гидроксилазы [9].

Компьютерное моделирование белок-лигандных взаимодействий широко применяется для прогноза биологической активности веществ, в том числе в отношении CYP [10-12]. В данной работе описаны *in silico* скрининг ряда гидразонов на основе кетостероидов и изониазида в качестве потенциальных лигандов CYP микобактерий и моделирование проницаемости этих соединений через липидные бислои. Также для ряда гидразонов изониазида со стероидами дегидроэпиандростерон, прегненолон, 16 α ,17 α -эпокипрегненолон и холестенон (IDHEA, IPRE, IEP5 и ICHN) выявлена способность проникать в клетки микобактерий на основе регистрации соответствующих 3-кето-4-еновых производных после инкубации с клетками бактерий и показано связывание IEP5 с очищенным CYP125 *in vitro*.

МЕТОДИКА

В работе использовали дегидроэпиандростерон, прегненолон, 16 α ,17 α -прегненолон, эстрон, холест-4-ен-3-он, изониазид, диметилсульфоксид (“Sigma-Aldrich”, Германия), метанол, ацетонитрил, этил ацетат (“Merck”, Германия), уксусную кислоту (“Реахим”, Россия). Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) со спектрофотометрическим и спектрофлуориметрическим детектированием проводили с использованием системы Dionex Ultimate-3000 (“Thermo Scientific”, США) и хроматографической колонки Poroshel C18 (150 \times 4 мм, диаметр частиц 5 мкм, “Agilent”, США)

и градиентного элюирования при 30°C со скоростью 1 мл·мин⁻¹ смесью вода-метанол. Элюирование осуществляли согласно схеме: 0-5 мин — 30%, 5-15 мин — 30-10%, 15-25 мин — 100%, 25-26 мин — 100-30%, 26-30 мин — 30%. ИК-спектры снимали на приборе Bruker Alpha (ATR-DI) ("Bruker", США) в диапазоне 4000-400 см⁻¹. Масс-спектрометрию с ионизацией методом электрораспыления (ESI-MS) осуществляли с использованием системы LCMS-2020 ("Shimadzu", Япония). Напряжение на детекторе 1,2 кВ, температура нагревательного блока и линии десольвации — 400°C и 250°C соответственно; N₂ использовался для десольвации (высушивания) и распыления при скоростях потока 1,5 л·мин⁻¹ и 15 л·мин⁻¹ соответственно. Элюирование осуществляли смесью метанол : вода (70 : 30 по объёму) со скоростью 0,1 мл·мин⁻¹ при 40°C. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) осуществляли с использованием с использованием силикагелевых пластинок Merck UV-254 ("Merck"). Вещества визуализировали при помощи лампы с максимумом излучения 254 нм (по фрагменту изониазида), а также после обработки серной кислотой и последующим нагреванием (для 3-гидрокси-5-ен стероидов).

Компьютерные расчёты

Для молекулярного докинга использовали AutoDock Vina 1.1.2 [13] (область докирования 4×4×4 нм по центру белка, шаг 0,1 нм, параметр Exhaustiveness 12, рассчитывалось 5 моделей). Во всех случаях использовали последовательности цепи А из файлов белков, в расчет принимали первые одну или две модели расположения конкретного лиганда в активном центре одной структуры белка с наименьшими значениями энергии связывания (E_{bind}). Табулировали данные о наиболее эффективных взаимодействиях (E_{bind} менее -10 ккал/моль, если не обозначено иное). Для подготовки файлов лигандов и белков, визуализации результатов использовали программный пакет MGL Tools (The Scripps research lab.). Файлы с 3D структурами белков (всего 77 структур: 1e9x, 1ea1, 1h5z, 1n40, 1n4g, 1u13, 1x8v, 2bz9, 2ci0, 2cib, 2ij5, 2ij7, 2uuq, 2uvn, 2vku, 2w09, 2w0a, 2w0b, 2wgy, 2wh8, 2whf, 2wm4, 2wm5, 2x5l, 2x5w, 2xc3, 2xkr, 2xn8, 2yoo, 3cxv, 3cxx, 3cxu, 3cxz, 3cy0, 3cy1, 3g5f, 3g5h, 3ivy, 3iw0, 3iw1, 3iw2, 3r9b, 3r9c, 3zby, 4apy, 4g1x, 4g2g, 4g44, 4g45, 4g46, 4g47, 4g48, 4ict, 4ips, 4ipw, 4iq7, 4iq9, 4j14, 4ktf, 4ktj, 4ktk, 4ktl, 4tri, 4uax, 4ynr, 4yof, 5dqn, 5edt, 5hdi, 5ibd, 5ibe, 5ibf, 5ibg, 5ibh, 5ibi, 5ibj, 5li6, 5li7, 5li8, 5lie, 5o4k, 5o4l, 5op9, 5opa, 5wp2, 6bld, 6dcd) были взяты из базы данных Protein Data Bank (www.rcsb.pdb.org). Структуры низкомолекулярных соединений построены и оптимизированы с использованием программы HyperChem 7.01, конформацию молекул определяли в приближении полуэмпирического метода AM1 по алгоритму Полака-Райбера (значение градиента не более 0,02). Эту же программу использовали для расчёта теоретических величин липофильности (LogP). Проницаемость через биологические фосфолипидные мембраны оценивали

с использованием интернет-ресурса PerMM (<https://permm.phar.umich.edu/server>) [14], используя параметры, заданные по умолчанию.

Общая процедура синтеза гидразонов кетостероидов и изониазида

Для получения исследуемых в работе соединений использовали модифицированную методику из публикации [15], описывающей получение схожих конъюгатов с 1-(карбоксиметил)пиридиния хлорид гидразином (реагентом Джирарда Р), представляющую собой растворение исходного кетостероида (дегидроэпинадростерона, прегненолона, 16 α ,17 α -эпоксипрегненолона или холест-4-ен-3-она) (5 мг/мл) в метаноле, добавление двукратного молярного избытка изониазида с последующим нагреванием смеси до 40-50°C растворов в присутствии 10% (об.) уксусной кислоты до исчезновения сигнала субстрата по ТСХ. Реакционные смеси упаривали досуха на роторном испарителе ИКА-20 (40°C, 15 мин, "ИКА", Германия), затем повторно растворяли в минимальном объёме метанола с последующим осаждением стероидов бидистиллированной водой с обработкой ультразвуком (60 Гц, 5 мин, 25°C) для удаления избытка изониазида. Далее суспензии стероидов центрифугировали (центрифуга Sigma 3-30KS, "Sigma-Aldrich", 4000 g, 2 мин, 25°C), осадки повторно растворяли в метаноле и упаривали досуха.

17-(андрост-5-ен-3 β -гидрокси)-изоникотинилгидразид (IDH): белые кристаллы, выход 90%; ВЭЖХ: время удерживания — 8,7 мин; ТСХ (хлороформ) Rf=0; ESI-MS: m/z 408,2 [M+H]⁺ (для C₂₅H₃₄N₃O₂⁺ рассчитано 408,27); ИК (плёнка из раствора в метаноле) 3200-3500 (O-H), 2830-2950 (C-H), 1637 (C=C), 1700 (-CO-NH-NH-), 1640 (C=N), 1480-1400 (C-C и C-N пиридина), 1450 (симметричная деформация CH₃-группы).

20-(прегн-5-ен-3 β -гидрокси)-изоникотинилгидразид (IPRE): белые кристаллы, выход 95%; ВЭЖХ: время удерживания — 10,8 мин.; ТСХ (хлороформ) Rf=0; ESI-MS: m/z 436,25 [M+H]⁺ (для C₂₇H₃₈N₃O₂⁺ рассчитано 436,30). Основные сигналы ИК спектра совпадали с таковыми для спектра IDH.

20-(16 α ,17 α -эпоксипрегн-5-ен-3 β -гидрокси)-изоникотинилгидразид (IEP5): белые кристаллы, выход 90%, ВЭЖХ: время удерживания — 10,7 мин.; ТСХ (хлороформ) Rf = 0; ESI-MS: m/z 450,25 [M+H]⁺ (для C₂₇H₃₆N₃O₃⁺ рассчитано 450,28), m/z 448,20 [M-H]⁻ (для C₂₇H₃₄N₃O₃⁻ рассчитано 448,26); ИК (плёнка из раствора в метаноле) 3200-3500 (O-H), 2830-2950 (C-H), 1640 (C=C), 1700 (-CO-NH-NH-), 1640 (C=N), 1480-1400 (C-C и C-N пиридина), 1450 (симметричная деформация CH₃-группы), 950-1150 (C-O-C).

3-(холест-4-ен)-изоникотинилгидразид (IChn): белые кристаллы, выход 98%; ВЭЖХ: время удерживания — более 30 мин; ТСХ (хлороформ) Rf = 0,2 (УФ 254 нм); ESI-MS: m/z 504,40 [M+H]⁺ (для C₃₃H₅₀N₃O⁺ рассчитано 504,40); ИК (плёнка из раствора в метаноле) 2830-2950 (C-H), 1650 (C=C), 1700 (NH-C-O), 1630-1610 (C=N), 1485-1400 (C-C и C-N пиридина), 1450 (симметричная деформация CH₃-группы).

Взаимодействие синтезированных веществ с микобактериями *in vitro*

В работе использовали штамм патогенных микобактерий *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Клетки культивировали при 37°C на полноценной питательной среде и 0,05% детергента Твин-80. По достижении плотности клеток, соответствующей оптическому поглощению при 600 нм (A₆₀₀), равному 0,35-0,40, к ним добавляли растворы стероидов в диметилсульфоксиде до концентрации 25 мкмоль/л. Аликвоты суспензии клеток (1 мл) отбирали в диапазоне 0-24 ч после добавления стероидов и затем экстрагировали 4 мл этилацетата при перемешивании в течение 5 мин. на вортексе, центрифугировании при 2000 g в течение 5 мин, упаривали при пониженном давлении, перерастворили в 500 мкл изопропанола и анализировали. Дополнительно проводили тест влияния на рост *M. tuberculosis* H₃₇Rv и *M. smegmatis* mc2 155 на указанной среде при начальном A₆₀₀=0,1 и концентрации стероидов 50 мкМ.

Спектрофотометрическое титрование CYP125 *M. tuberculosis* соединением IEP5

Препарат CYP125 был получен с использованием рекомбинантных бактерий *Escherichia coli*, на базе Лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии Института биоорганической химии НАН Беларуси в кооперации с к.х.н. Гилепом А.А. Взаимодействие полученных веществ с CYP125A1 определялось в буферном растворе 50 мМ фосфата натрия, 20% глицерина, 1% Твин-80 на спектрофотометре Solar PB 2201 ("Солар", Беларусь). К буферу добавлялся раствор белка до концентрации 0,5 мкМ, и спектр полученного раствора принимался за нулевую линию. После чего к раствору прибавляли аликвоты раствора

полученных веществ в этаноле и наблюдали за изменением спектра. Связывание с лигандами наблюдали по увеличению (A₄₂₅-A₃₉₀).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были исследованы гидразоны кетостероидов и изонозида (рис. 1), которые могут существовать в виде E- и Z-изомеров в зависимости от взаиморасположения фрагментов конъюгата относительно двойной C=N связи.

Вследствие объединения фрагментов двух биоактивных соединений в одной молекуле данные гидразоны могут обладать широким спектром свойств, однако в нашем исследовании акцент сделан на расчётной оценке их способности взаимодействовать с CYP микобактерий. Это интересно, так как отмечена связь вирулентности или выживаемости *M. tuberculosis* с CYP125 [16], и роль других CYP в качестве мишеней потенциальных лекарств также обсуждается [5, 17]. Отметим, что пиридиновый цикл данных гидразонов может выступать лигандом гема CYP за счёт возможности образования Fe-N координационной связи. Наличие такого фрагмента в боковой цепи производных на основе дегидроэпиандростерона, прегненолона и 16α,17α-эпоксиpregненолона (IDH, IPRE и IEP5 соответственно) создаёт предпосылки для ингибирования CYP125, осуществляющего C27-окисление боковой цепи холестерина [6, 9]. С другой стороны, способность подавлять рост микобактерий описана для ряда гидразонов изонозида [18], в том числе стероидных [19].

Для оценки полученных соединений в качестве лигандов CYP микобактерий (всего 8 вариантов) проведён их докинг с множеством из 77 известных трёхмерных структур этих ферментов (виртуальный скрининг). Теоретически рассчитанные энергии

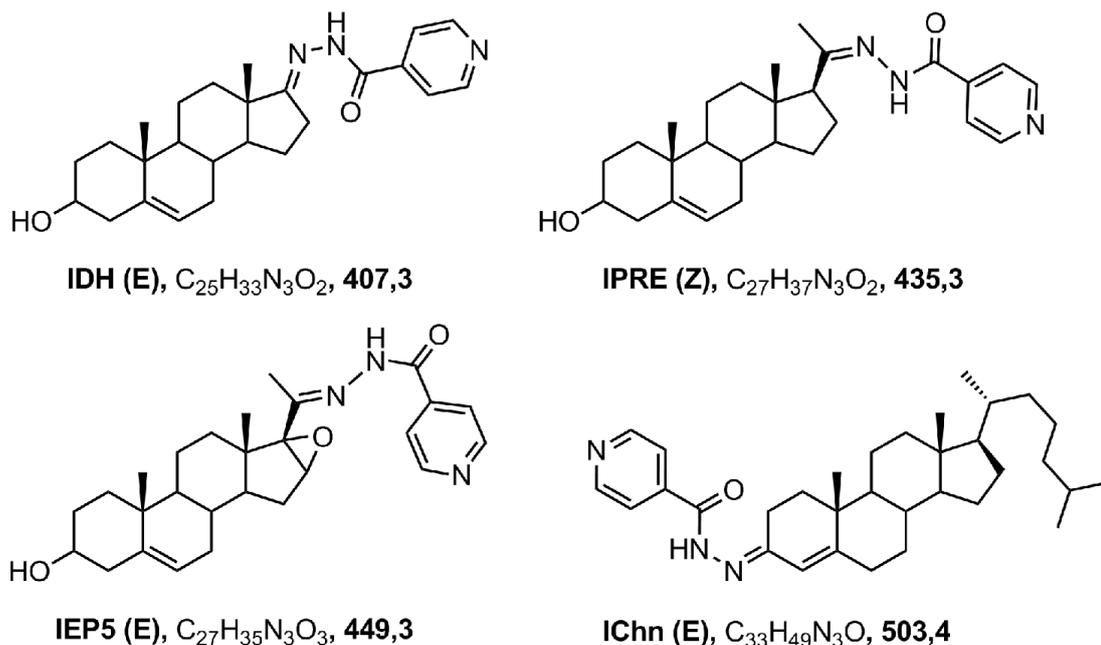


Рисунок 1. Структурные формулы синтезированных соединений и их условные обозначения (в скобках указана соответствующая E- или Z- форма структур на рисунке).

связывания (E_{bind}) исследуемых гидразонов с СУР микобактерий находятся в диапазоне от -12,6 ккал/моль до -7 ккал/моль. Данные о наиболее эффективных взаимодействиях приведены в таблицах 1 и 2.

Отметим, что возможность локализации с близким (не более 0,4 нм) расположением N-атома пиридинового цикла и гема была выявлена также для ряда других цитохромов P450 микобактерий, а именно белков с неустановленными субстратами СУР130 (2uvn) и СУР126A1 (5li6), а также микоциклозин-синтазы СУР121 и ланостерол-14 α -деметилазы СУР51 (2w09) (табл. 1, 2). Эффективное связывание вблизи гема указывает на возможность соединения выступать в роли

ингибитора конкретного СУР, хотя роль субстрата также возможна. Показана также возможность аффинного связывания полученных гидразонов с СУР125 микобактерий. Поскольку этот фермент способен катализировать окислительную деструкцию С-Н, N-Н, С-С и С-N связей своих субстратов [20], их взаимодействия со стероидными гидразонами могут привести к превращению последних или ингибированию этого фермента. Поскольку СУР125 катализирует С27-окисление холестерина, и его активность может ингибироваться стероидами с модифицированной боковой цепью [5, 6, 9], мы рассчитали эффективность взаимодействия указанных гидразонов для 10 известных трёхмерных структур этого фермента (табл. 3).

Таблица 1. Величины теоретически-рассчитанных E_{bind} (ккал/моль) и данные о ко-локализации вблизи гема ферментов для соединений IDH и IEP5

	IDH (E)	IDH (Z)	IEP5 (E)	IEP5 (Z)
СУР121	5ibe -11,5 #h 4iq7 -10,9 #h 4ktj -10,8 #h	5ibe -11,6 #h 5o4l -11,3 #h 4ktk -11,2 #h 3cy1 -11,0 #h 4ktj -11,1 #h	5ibe -11,9 #h 1n4g -11,6 5ibj -11,5 5o4k -11,5 #h 4iq7 -11,4 #h	5ibe -11,6 #h 5ibg -11,5 #h 5o4k -11,5 #h 4iq7 -11,4 #h 4ktj -11,3 #h
СУР124	2wm4 -11,0 #h	2wm4 -11,6	2wm4 -12,0	2wm4 -11,5 #h
СУР125	2x5w -11,9	2x5w -10,7	2x5w -11,6	2x5w -12,5 #hpy
СУР126A1	5li8 -9,3 #h	5li8 -8,9	5li8 -10,4 #h	5li8 -10,0 #hpy
СУР130	2uvn -12,2 #hpy	2uvn -11,3 #hpy	2uvn -10,7	2uvn -10,8
СУР51	1e9x -11,1 #h 2w09 -11,2 2w0b -11,1 #h	1x8v -11,8 #h	2w0b -11,6 #h 2w09 -12,0 #hpy	1e9x -11,7 #h 2w0b -11,7 #h 2w09 -11,3 #h

Примечание: в ячейке указаны код pdb структуры и соответствующая энергия взаимодействия (E_{bind} , ккал/моль); отметки #hpy и #h означают для рассчитанной локализации молекулы расстояние от гема фермента до атома пиридинового цикла или другого атома, соответственно, составляет не более 0,4 нм.

Таблица 2. Величины теоретически-рассчитанных E_{bind} (ккал/моль) и данные о ко-локализации вблизи гема ферментов для исследуемых гидразонов IPRE и IChn

	IPRE (E)	IPRE (Z)	IChn (E)	IChn (Z)
СУР121	4ktl -11,9 4ktj -11,7 4g48 -11,5 5ibe -11,6 #h 4ktf -11,5	5ibe -11,8 #h 4g48 -11,3 #h 5o4k -11,5 #h 4ktf -11,4 5opa -11,4	5ibe -11,3 #h 3cy1 -11,0 #hc27 5ibj -10,6 #h	4g48 -11,9 #h 5ibh -11,7 #h 1n4g -11,6 #h 4iq7 -11,7 #h
СУР124	2wm4 -12,0	2wm4 -11,7	2wm4 -11,2 #hc27 2wm5 -10,0	2wm4 -8,9 #h 2wm 9,6
СУР125	2x5w -11,5	2x5w -11,9 #h	2x5w -12,0 #h 3iw0 -11,1	2x5w -12,4 #hc27 3iw0 -10,5
СУР126	5li8 -9,7 #h	5li8 -10,0 #h	5li8 -11,7 #hc27 5le -9,0 #h	5li8 -8,6 5le -9,0 #h
СУР142	2yoo -10,5	2yoo -9,8	2yoo -11,2	2yoo -11,6
СУР51	2w09 -11,7 #hpy 2w0b -11,9 #h	2w09 -11,1 2w0b -12,0 #h	1e9x -11,9 #h 2w0b -11,5 #h	1e9x -12,8 2w0b -11,1 #h
СУР164	3r9c -10,8	3r9c -11,3 #h	3r9c -10,5 #h	3r9c -11,3 #h

Примечание: #hpy и #h — для рассчитанной локализации молекулы расстояние от гема фермента до атома пиридинового цикла или другого атома, соответственно, составляет не более 0,4 нм; #hc27 — для рассчитанной локализации молекулы расстояние от гема фермента до С27-атома боковой цепи холестерина составляет не более 0,4 нм.

IN SILICO ИССЛЕДОВАНИЕ КОНЬЮГАТОВ ИЗОНИАЗИД-СТЕРОИД

Таблица 3. Величины теоретически-рассчитанных E_{bind} (ккал/моль) и данные о ко-локализации вблизи гема ферментов для исследуемых гидразонов изониазида для 10 структур CYP125

CYP125	IDH (E)	IDH (Z)	IEP5 (E)	IEP5 (Z)	IPre (Z)	IPre (E)	ICCh (Z)	ICCh (E)
2x5l	-10,4	-10,3	-11,2	-10,1	-10,6	-11,3	-10,1	-10,8
2x5w	-11,8	-10,7 #hpy	-11,6 -11,3 #hpy	-12,5 s#hpy	-12,1 -11,9 #hpy	-11,5	-12,4 #hc27	-12,0 #hpy
2xc3	-9,1	-9,2	-10,1	-9,9	-11,1 #hpy	-10,0	-9,2	-9,7
2xn8	-10,0	-10,6	-10,5	-10,9	-10,9	-10,5	-9,7	-10,7
3ivy	-9,8	-9,2	-10,2	-10,2	-10,5	-10,2	-11,2	-11,3
3iw0	-10,7	-10,8	-11,1	-10,5	-10,6	-11,1	-10,5	-11,1
3iw1	-9,6	-9,5	-10,3	-10,7	-10,4	-10,1	-10,4	-10,6
3iw2	-10,1	-10,4	-10,7	-10,4	-10,1	-11,1	-10,5	-9,7
4apy	-8,8	-9,4	-9,1	-9,9	-10,8 #hpy	-10,4	-8,7	-8,6
5dqn	-9,3	-8,7	-9,9	-9,6	-9,8	-9,7	-8,8	-7,7

Примечание: жирным выделены наименьшие значения E_{bind} для соответствующих соединений, рядом отмечена ко-локализация гема этих P450 с фрагментом пиридина (#hpy) или C27 (#hc27) атомом стероида. Для IPRE и IEP5 указаны первая и вторая* по величине E_{bind} для моделей положения лиганда.

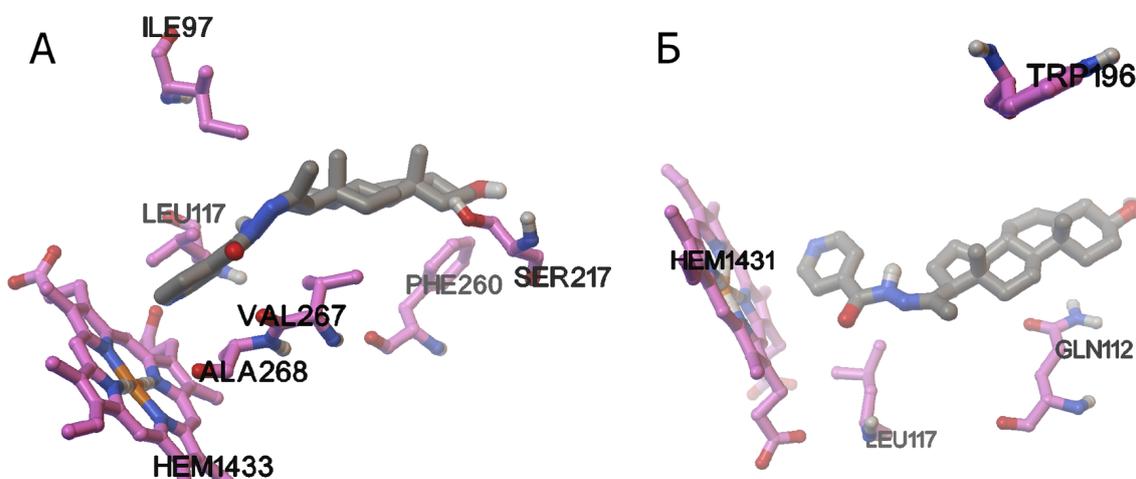


Рисунок 2. Рассчитанная локализация соединения IPRE (Z-изомер) в активном центре цитохрома P450 CYP125 для структур с кодом pbd 2xc3 (А, $E_{bind} = -11,1$ ккал/моль) и 2x5w (Б, $E_{bind} = -11,9$ ккал/моль). Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи на сайте журнала.

Приведённые данные позволяют предположить возможность связывания полученных гидразонов с CYP125 микобактерий, причём IEP5 и IPRE (изомеры Z) могут ингибировать этот фермент за счёт связывания в активном центре и ко-локализацией гема и пиридинового фрагмента этих соединений (табл. 3, рис. 2).

Возможность связывания IEP5 с CYP125 подтверждена экспериментально с использованием метода спектрофотометрического титрования по характеристическому изменению спектра поглощения данного гемопротейна, а именно по увеличению амплитуды $A_{425}-A_{390}$, что характерно для взаимодействия CYP с ингибиторами (рис. 3).

В согласии с результатами докинга, IPRE характеризовался схожей аффинностью, а IDH и ICCh не вызывали таких спектральных изменений.

Для оценки проницаемости полученных соединений через липидный бислой были проведены расчёты с использованием ресурса Permeability of Molecules across Membranes (PerMM, <https://permm.phar.umich.edu>), результаты которых приведены в таблице 4.

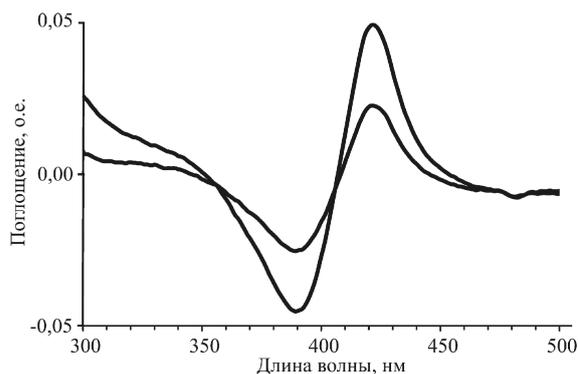


Рисунок 3. Экспериментальные спектральные изменения II типа, полученные при титровании CYP125 (1 мкМ) раствором IEP5 (финальные концентрации 2,2 мкМ и 6,6 мкМ), указывающие на эффективное связывание в активном центре этого белка,

Полученные данные количественно характеризуют увеличение гидрофобности и способности к неспецифическому транспорту через липидные слои исследуемых гидразонов; наибольшие величины коэффициента проницаемости получены для ICCh и Z-изомера IPRE.

Следует отметить, что помимо плазматической мембраны клетки микобактерий обладают дополнительным внешним липидным бислоем (микомембраной), состоящим из специфических липидов (миколоевых кислот и их эфиров) [2-4]. В работе [21] была проведена теоретическая оценка проницаемости монослоя миколоевых кислот для ряда лекарств в приближении метода ММ2; было показано наличие корреляции коэффициентов проницаемости и слоя димиристоил фосфатидилхолина. Это позволяет использовать проведенные с использованием PerMM расчёты для сравнительной оценки проницаемости веществ внутрь клеток микобактерий. Создание более совершенной модели является предметом наших дальнейших исследований. При интерпретации результатов моделирования проницаемости внутрь клеток микобактерий также важно учитывать наличие специальных мембранных белков транспорта холестерина, например, оперона *mse4* [22], которые могут влиять на способность стероидных соединений накапливаться в микобактериях.

Эксперимент *in vitro* позволил установить, что при инкубации с клетками *M. tuberculosis* соединение IDh превращается в некие соединения, характеризующиеся меньшим временем удерживания на ВЭЖХ, чем субстрат. Масс-спектрометрический анализ образца превращения IDh позволил установить, что один из продуктов характеризуется сигналами катионов с $m/z=406$, что указывает на 3-кето-производное с молекулярной массой на 2 а.е. меньше по сравнению с таковой для субстрата, дающего в аналогичных условиях сигнал $[M+H]^+$ с $m/z=408$ (рис. 4).

В случае превращения IPRE после 24 ч инкубации также наблюдалось несколько продуктов со временем удерживания меньшим, чем таковое для субстратов; масс-спектрометрический анализ выявил сигналы нескольких катионов, в том числе с $m/z=434$, что также указывает на образование дегидропроизводного IPRE (рис. 5).

Таблица 4. Результаты теоретического расчёта логарифмических коэффициентов проницаемости через бислоюную липидную мембрану (BLM) и рассчитанные коэффициенты липофильности LogP

	IDH (E)	IDH (Z)	IEP5 (E)	IEP5 (Z)	Ipre (Z)	Ipre (E)	Ich (Z)	Ich (E)	Ch	INH
Log (BLM)	-0,57	-0,43	-2,41	-0,83	1,03	-0,49	4,88	4,44	5,90	-1,58
LogP	5,14	5,14	4,46	4,46	5,40	5,40	9,04	9,04	7,17	2,68

Примечание: Ch — холестерин, INH — изониазид.

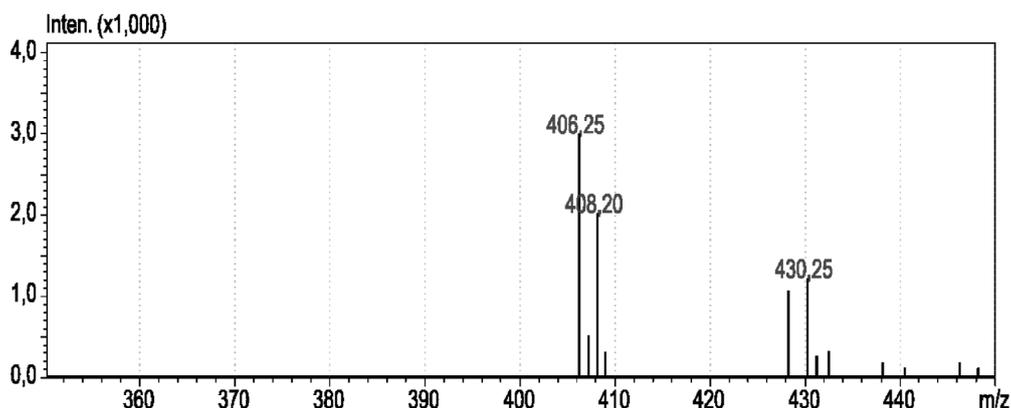


Рисунок 4. Масс-спектр, полученный при анализе экстракта суспензии микобактерий, инкубированных со стероидом IDh, показывающий образование продукта с молекулярной массой на 2 а.е. меньше, чем у субстрата, который даёт сигналы ионов $[M+H]^+$ с $m/z=406$ и $[M+Na]^+$ с $m/z=428$ (против $[M+H]^+$ с $m/z=408$ и $[M+Na]^+$ с $m/z=430$ для субстрата).

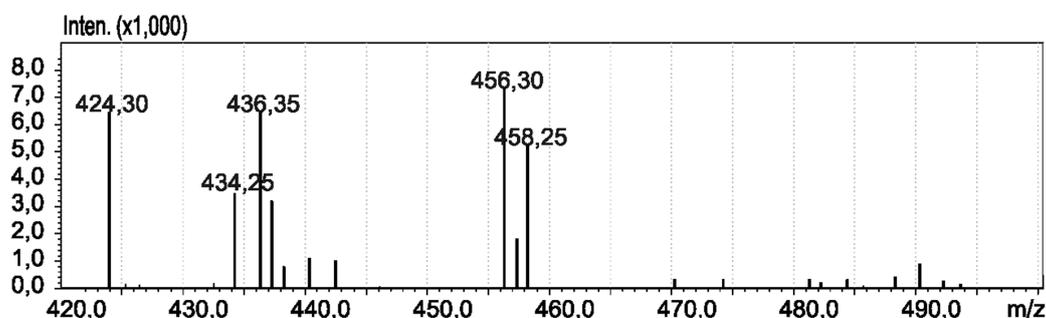


Рисунок 5. Масс-спектр, полученный при анализе экстракта суспензии микобактерий, инкубированных со стероидом IPRE, показывающий образование продукта с молекулярной массой на 2 а.е. меньше, чем у субстрата, который даёт сигналы ионов $[M+H]^+$ с $m/z=434$ и $[M+Na]^+$ с $m/z=456$ (против $[M+H]^+$ с $m/z=436$ и $[M+Na]^+$ с $m/z=458$ для субстрата).

Важно отметить, что в случае IEP5 также детектировались продукты превращения его клетками микобактерий, тогда как в случае ICh субстрат оставался интактным в течение 24 ч. Наблюдаемое превращение 3 β -гидрокси-5- α -стероидов IDh, IEP5 и IPRE согласуется с ранее полученными данными о способности стеролообразных соединений с модифицированной боковой цепью проникать внутрь клеток и превращаться 3 β -гидроксистероид-дегидрогеназой микобактерий [23], которая является внутриклеточным НАД⁺-зависимым ферментом этих микроорганизмов [24]. Следовательно, поскольку аналогичное превращение невозможно внеклеточными ферментами *M. tuberculosis*, обнаружение таких метаболитов указывает на проникновение соединения в клетку.

Для выяснения влияния полученных соединений на жизнеспособность клеток микобактерий была проведена оценка их влияния на рост *M. tuberculosis* H₃₇Rv и *M. smegmatis* mc2 155. В случае медленно растущих *M. tuberculosis* наблюдалось подавление роста этих микроорганизмов (на 50% по сравнению с контролем без добавок стероидных гидразонов на 4 день инкубации) всеми исследуемыми соединениями. В случае быстро растущих *M. smegmatis* подавления роста не наблюдалось. Мы полагаем, что наблюдаемое в первом случае подавление роста связано с гидролитической деструкцией гидразонов до кетостероида и свободного изониазида, которая становится значимой за счёт длительной инкубации в водной среде при 37°C, а сами конъюгаты в используемых концентрациях не оказывают выраженного цитотоксического эффекта на клетки микобактерий в условиях эксперимента на превращения.

Таким образом, в ходе работы были получены четыре гидразона изониазида и различных кетостероидов, проведены *in silico* исследования их способности взаимодействовать с рядом цитохромов P450 микобактерий и экспериментально оценена их способность поглощаться и превращаться микобактериями. Расчёты также подтверждают повышение проницаемости стероидных гидразонов через липидные бислои по сравнению с изониазидом. В результате выявлено, что для экспериментальной проверки белок-лигандного взаимодействия из этих оксдоредуктаз наиболее перспективными являются CYP121, CYP124, CYP125, CYP126A1, CYP130 и CYP51 вследствие выявленной *in silico* возможности связывания с этими белками (E_{bind} от -9 ккал/моль до -12 ккал/моль). Продемонстрированное *in vitro* взаимодействие с CYP125 подтверждает результаты докинга. В условиях эксперимента наблюдаемые токсические эффекты соединений на клетки микобактерий опосредованы, вероятно, высвобождением изониазида из состава гидразонов вследствие их гидролитической деструкции.

Выявленное при масс-спектрометрическом анализе превращение гидразонов на основе 3 β -гидрокси-5- α -стероидов в 3-кето-4-еновые производные расширяет теоретические представления

о субстратной специфичности ферментов метаболизма стероидов микобактериями и может учитываться при дизайне потенциальных стероидных субстратов и ингибиторов ферментов микобактерий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий и кафедры органической химии (химический факультет, Белорусский государственный университет) за возможность проведения масс-спектрометрического и ИК-спектроскопического анализа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта Белорусского фонда фундаментальных исследований Б18МС-026.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Гилеп К.А. и Фальчевская А.С. участвовали в синтезе исследованных гидразонов и тестировании взаимодействия с CYP125 в рамках выполнения дипломных работ на химическом факультете БГУ в 2019 г. под руководством Шкуматова В.М. и Фалетрова Я.В. соответственно. Авторы благодарят к.х.н. Гилепа А.А. за эссенциальную помощь в получении препарата очищенного микобактериального CYP125. Другие авторы постулируют отсутствие потенциальных конфликтов, связанных с публикацией данного материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. MacNeil A., Glaziou P., Sismanidis C., Date A., Maloney S., Floyd K. (2020) MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep., **69**, 281-285.
2. Cui Z.J., Zhang W.T., Zhu Q., Zhang Q.Y., Zhang H.Y. (2020) Protein Pept. Lett., DOI: 10.2174/0929866527666200313113157.
3. Reis W.J., Bozzi Í.A.O., Ribeiro M.F., Halicki P.C.B., Ferreira L.A., Almeida da Silva P.E., Ramos D.F., de Simone C.A., da Silva Júnior E.N. (2019) Bioorg. Med. Chem., **27**, 4143-4150.
4. Vosátka R., Krátký M., Švarcová M., Janoušek J., Stolaříková J., Madaacký J., Huszár S., Mikušová K., Korduláková J., Trejtnar F., Vinšová J. (2018) Eur. J. Med. Chem., **151**, 824-835.
5. Bonds A.C., Sampson N.S. (2018) Curr. Opin. Chem. Biol., **44**, 39-46.
6. Frank D.J., Zhao Y., Wong S.H., Basudhar D., de Voss J.J., Ortiz de Montellano P.R. (2016) J. Biol. Chem., **291**, 7325-7333.

7. Ortega Ugalde S., Boot M., Commandeur J.N.M., Jennings P., Bitter W., Vos J.C. (2019) Appl. Microbiol. Biotechnol., **9**, 3597-3614.
8. Brzezinska M., Szulc I., Brzostek A., Klink M., Kielbik M., Sulowska Z., Pawelczyk J., Dziadek J. (2013) BMC Microbiol., **13**, 43. DOI:10.1186/1471-2180-13-43
9. Hu Y., van der Geize R., Besra G.S., Gurcha S.S., Liu A., Rohde M., Singh M., Coates A. (2010) Mol. Microbiol., **75**, 107-121.
10. Поройков В.В. (2020) Биомедицинская химия, **66**(1), 30-41. [Poroikov V.V. (2020) Biomeditsinskaya Khimiya, **66**(1), 30-41.]
11. Ершов П.В., Яблоков Е.О., Мезенцев Ю.В., Калужский Л.А., Флоринская А.В., Веселовский А.В., Гнеденко О.В., Гилеп А.А., Усанов С.А., Медведев А.Е., Иванов А.С. (2017) Биомедицинская химия, **63**(2), 170-175. [Ershov P.V., Yablokov E.O., Mezentssev Y.V., Kalushskiy L.A., Florinskaya A.V., Veselovsky A.V., Gnedenko O.V., Gilep A.A., Usanov S.A., Medvedev A.E., Ivanov A.S. (2017) Biomeditsinskaya Khimiya, **63**(2), 170-175.]
12. Панада Я.В., Фалетров Я.В., Фролова Н.С., Шкуматов В.М. (2019) Биомедицинская химия, **65**(4), 324-330. [Panada J.U., Faletrov Y.V., Frolova N.S., Shkumatov V.M. (2019) Biomeditsinskaya Khimiya, **65**(4), 324-330.]
13. Trott O., Olson A.J. (2010) J. Comput. Chem., **31**, 455-461.
14. Lomize A.L., Hage J.M., Schnitzer K., Golobokov K., LaFaive M.B., Forsyth A.C., Pogozheva I.D. (2019) J. Chem. Inf. Model., **59**, 3094-3099.
15. Lavrynenko O., Nediakov R., Müller H.M., Shevchenko A. (2013) J. Lipid Res., **54**, 2265-2272.
16. McLean K.J., Lafite P., Levy C., Cheesman M.R., Mast N., Pikuleva I.A., Leys D., Munro A. (2009) J. Biol. Chem., **284**, 35524-35533.
17. Ortega Ugalde S., Boot M., Commandeur J.N.M., Jennings P., Bitter W., Vos J.C. (2019) Appl. Microbiol. Biotechnol., **9**, 3597-3614.
18. Sampiron E.G., Costacurta G.F., Baldin V.P., Almeida A.L., Ieque A.L., Santos N.C., Alves-Olher V.G., Vandresen F., Gimenes A.C., Siqueira V.L., Caleffi-Ferracioli K.R., Cardoso R.F., Scodro R.B. (2019) Future Microbiol., **14**, 981-994.
19. Merlani M.I., Kemertelidze E.P., Papadopoulos K., Men'shova N.I. (2004) Rus. J. Bioorg. Chem., **30**, 497-501.
20. Guengerich F.P., Munro A.W. (2013) J. Biol. Chem., **288**, 17065-17073.
21. Hong X., Hopfinger A.J. (2004) Biomacromolecules, **5**, 1066-1077.
22. Sinha R., Singh P., Saini N.K. et al. (2018) Tuberculosis (Edinb.), **109**, 52-60.
23. Faletrov Y., Brzostek A., Plocinska R., Dziadek J., Rudaya E., Edimecheva I., Shkumatov V. (2017) Steroids, **117**, 29-37.
24. Yang X., Dubnau E., Smith I., Sampson N.S. (2007) Biochemistry, **46**, 9058-9067.

Поступила в редакцию: 31. 03. 2020.

После доработки: 15. 07. 2020.

Принята к печати: 31. 07. 2020.

IN SILICO MODELING OF ISONIAZID-STEROID CONJUGATES INTERACTIONS WITH CYTOCHROMES P450 OF MYCOBACTERIA & THEIR BIOCONVERSION IN VITRO BY THE CELLS

Y.V. Faletrov^{1,2}, K.A. Gilep¹, A.S. Falchevskaya¹, M.S. Horetski^{1,2}, J.V. Panada^{1,2},
E.V. Andrievskaya², E.V. Rudaya¹, N.S. Frolova², A. Brzostek³, R. Plocinska³, V.M. Shkumatov^{1,2*}

¹Faculty of Chemistry, Belarusian State University,
14 Leningradskaya str., Minsk, 220030 Belarus

²Research Institute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University,
14 Leningradskaya str., Minsk, 220030 Belarus; *e-mail: biopharm@bsu.by

³Institute for Medical Biology, Polish Academy of Sciences,
106 Lodowa str., 93-232, Lodz, Poland

Molecular docking of four hydrazones of isoniazid with steroids (dehydroepiandrosterone, pregnenolone, 16 α ,17 α -epoxypregnenolone, cholestenone) — IDHEA, IPRE, IEP5, ICHN, to mycobacterial cytochromes P450 was performed. The *in silico* study has shown that these hydrazones can be effectively bound to CYP121, CYP124, CYP125, CYP126A1, CYP130, and CYP51 with binding energy ranged from -9 kcal/mol to -12 kcal/mol. Calculations also demonstrated enhancement of passive lipid bilayer permeability with respect to isoniazid. *In vitro* IDHEA, IPRE, IEP5 were found to undergo bioconversion into their 3-keto-4-en derivatives. This suggests their ability to penetrate into *M. tuberculosis* H₃₇Rv cells. The results of this study are important in the context of understanding of specificity of binding of synthetic steroid derivatives to mycobacterial CYPs and indicate the possibility of using the steroid compounds studied by us as new ligands for these enzymes.

Key words: isoniazid; steroids; conjugates; molecular docking; mycobacterium; cytochromes P450

Funding. This work was supported by grant B18MS-026 from Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research.

Received: 31.03.2020; revised: 15.07.2020; accepted: 31.07.2020.