БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2022, том 48, № 1, с. 98–108

УДК 577.181.6:577.112.7

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛ-β-ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФТОРХИНОЛОНОВ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. Л. Р. Якупова*, #, Т. Ю. Копнова*, А. А. Скуредина*, Е. В. Кудряшова*

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/3

Поступила в редакцию 09.04.2021 г.
После доработки 08.05.2021 г.
Принята к публикации 18.05.2021 г.

Исследовано влияние природы фторхинолонов (на примере ципрофлоксацина и левофлоксацина) и их комплексообразования с метил-β-циклодекстрином на взаимодействие лекарственного препарата с сывороточным альбумином человека. Установлено, что на связывание лекарственной молекулы с альбумином существенно влияет структура фторхинолона, а также присутствие метил-β-циклодекстрина. С применением методов кругового дихроизма и флуоресцентной спектроскопии было установлено, что из двух фторхинолонов с белком сильнее взаимодействует более гидрофобная молекула ципрофлоксацина. Также было показано, что связывание альбумина с лекарством вызывает тушение флуоресценции белка, причем данный эффект более выражен для ципрофлоксацина. Комплексообразование фторхинолонов с метил-β-циклодекстрином приводит к изменению характера взаимодействия фторхинолонов с белком: в случае комплексов наблюдаются более выраженные взаимодействия для левофлоксацина. Полученные результаты открывают новые перспективы использования фторхинолонов в клинической практике путем разработки высокоэффективных препаратов с усовершенствованными свойствами.

Ключевые слова: сывороточный альбумин человека, фторхинолоны, метил-β-циклодекстрин, флуоресцентная спектроскопия

DOI: 10.31857/S0132342322010146

ВВЕДЕНИЕ

Фторхинолоны (ФХ) – один из крупнейших классов антибактериальных препаратов [1], широко используемых в медицине [2]. ФХ обладают рядом важных физико-химических свойств антибактериального препарата: 1) широким спектром активности, который включает грамотрицательные и грамположительные аэробные и анаэробные бактерии, а также микобактерии; 2) химической и биологической стабильностью; 3) разнообразными способами введения в организм [3].

Действие ФХ основано на избирательном ингибировании ДНК-гиразы (топоизомеразы II типа) и топоизомеразы IV, что позволяет блокировать репликацию ДНК микроорганизмов, при этом ДНК клеток млекопитающих не затрагивается из-за высокой специфичности ФХ к бактериальным ферментам. Блокирование ДНК-гиразы приводит к прекращению деления бактериальных клеток и их гибели [4]. Несмотря на высокую эффективность ФХ, длительная терапия и высокие дозировки препарата могут приводить к ряду побочных эффектов, снижения вероятности появления которых можно добиться созданием высокоэффективных систем доставки. Перспективным вариантом таких систем могут быть комплексы ФХ с циклодекстринами (ЦД) [5].

ЦД и их производные представляют большой интерес для фармацевтической промышленности. Они способствуют увеличению растворимости [6, 7], биодоступности и стабильности лекарственных препаратов, уменьшают токсичность, позволяют варьировать фармакокинетические свойства биологически активных молекул [1, 8]. Несмотря на широкое использование лекарственных формуляций на основе ЦД, взаимодействие комплексов с биологическими веществами требует более детального рассмотрения. Для успешного использования ФХ и их комплексов с ЦД в медицинской практике необходимо изучить их взаимодействие с белками плазмы крови, с которыми формуляции неизбежно взаимодействуют на пути к очагу инфекции при внутривенном введении в организм. Большинство лекарств цир-

Сокращения: ЛВ – левофлоксацин; М-β-ЦД – метил-β-циклодекстрин; ФХ – фторхинолон; ЦД – циклодекстрин; ЦФ – ципрофлоксацин; ЧСА – сывороточный альбумин человека.

#Автор для связи: (тел.: +7 (977) 713-21-54; эл. почта: Yakupova.Linara@mail.ru).

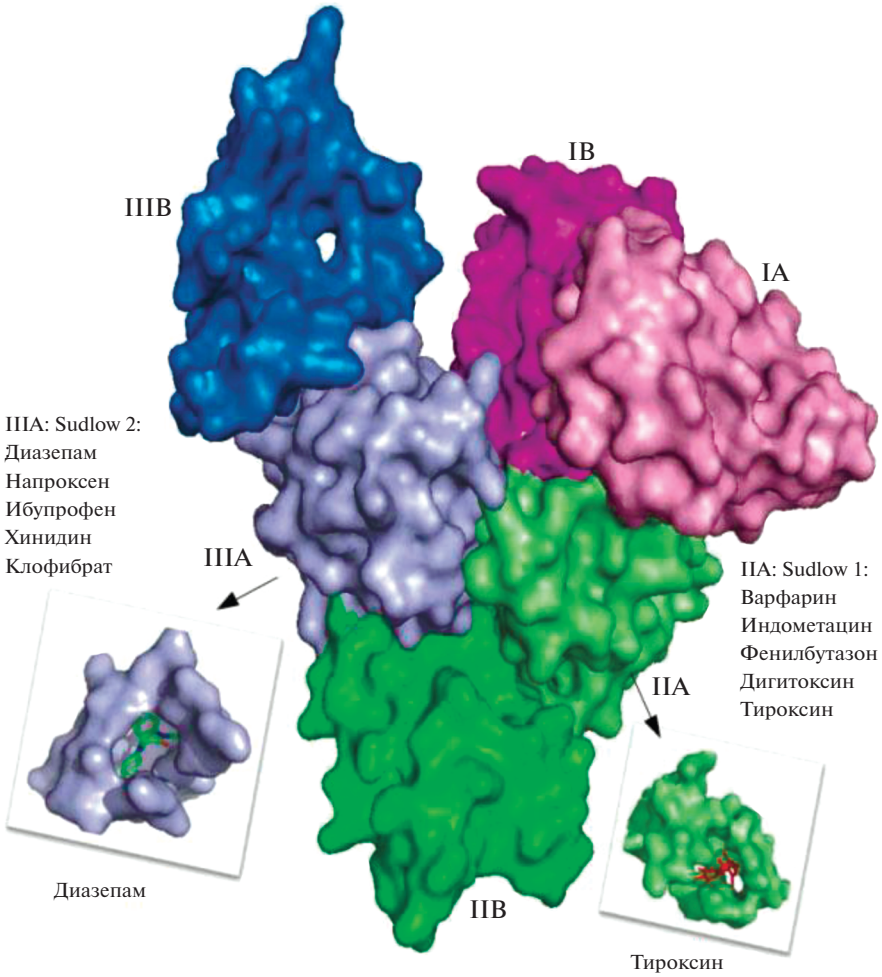

Рис. 1. Структура сывороточного альбумина человека и сайты связывания с лигандами [13].

кулирует в кровотоке, обратимо связываясь с белками плазмы. Связывание лекарств с другими белками плазмы (например, липопротеинами высокой и низкой плотности) происходит в гораздо меньшей степени [9].

Сывороточный альбумин человека (ЧСА) – основной белок в плазме крови. ЧСА представляет собой глобулярный многофункциональный белок, состоящий из трех фрагментов: доменов I (1–195 а.о.), II (196–383 а.о.) и III (384–585 а.о.) (рис. 1). Они топологически идентичны и имеют сходную третичную структуру [10, 11], но каждый фрагмент обеспечивает специфические структурные и функциональные характеристики [12].

ЧСА связывает и переносит различные вещества, такие как гормоны, жирные кислоты, лекарственные молекулы и др. [12]. В основном он связывается с кислотными и нейтральными, анионными лекарствами [9, 13]. В структуре ЧСА на данный момент известны семь сайтов связывания, из них можно выделить два основных, в которых связываются лекарственные молекулы: Sudlow 1 в субдомене IIA и Sudlow 2 в субдомене IIIA [13, 14]. Как правило, для каждого лекарства характерен один или два сайта связывания с ЧСА: так, ацетилсалициловая кислота (аспирин) практически равномерно распределяется между субдоменами IIA и IIIA [15]. Известно, что ФХ связываются с ЧСА в субдомене IIA, вблизи области связывания хлороформа [12]. Для изучения сайта связывания лекарственных молекул с ЧСА применяют различные спектральные методы, например, флуоресцентную спектроскопию с использованием специальных меток, таких как дансил-L-аспарагин, дансил-L-аргинин и дансил-L-глутамат [12].

ЧСА обеспечивает перенос лекарственных молекул к почкам, кишечнику, печени и другим органам [10]. Для многих препаратов описано изменение фармакокинетических и фармакодинамических свойств, а также биораспределения при связывании с ЧСА [9].

Несмотря на то, что взаимодействие ЧСА с ФХ активно изучается, влияние особенностей структуры ФХ, а особенно их комплексов ФХ–ЦД, на

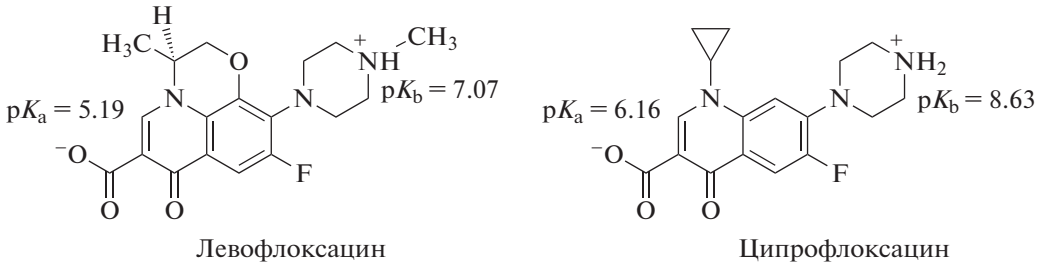

Рис. 2. Структурные формулы фторхинолонов: левофлоксацина и ципрофлоксацина (при pH 7.4) [21].

взаимодействие лекарства с ЧСА – актуальная и пионерская область для исследований.

Цель данной работы – изучение влияния метил-β-циклодекстрина (М-β-ЦД), широко используемого в биомедицине, на связывание ЧСА с ФХ (ципрофлоксацином и левофлоксацином), имеющими различную архитектуру. Для анализа данных взаимодействий был использован комплекс спектроскопических методов, которые позволяют определить основные параметры связывания. Кроме того, важно изучить, как происходит связывание ЧСА с ФХ при различных мольных соотношениях ФХ : белок. Один из способов применения препарата – внутривенное введение, при этом дозировки препарата составляют ~200–400 мг, максимальная концентрация в крови достигает значений ~2.8–6.7 мг/л [16]. Нормальный уровень ЧСА у взрослого человека – 35–50 г/л. Следовательно, мольное соотношение ФХ к ЧСА после полного распределения составляет от 1 : 25 до 1 : 40. Но, поскольку препарат вводится локально, это соотношение может кардинально изменяться, и необходимо рассматривать также и большие избытки ФХ по отношению к ЧСА, при которых механизм взаимодействия лекарственных препаратов с белком может быть другим.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В структурной организации молекул левофлоксацина (ЛВ) и ципрофлоксацина (ЦФ) есть несколько принципиальных отличий, которые обусловливают различия в химических свойствах (рис. 2). Во-первых, ЛВ обладает дополнительным гетероциклом, содержащим атом кислорода, неподеленная электронная пара которого способна вступать в сопряжение со всей ароматической системой молекулы, тем самым увеличивая делокализацию π-электронной плотности и, как следствие, гидрофильность молекулы. Во-вторых, азот, располагающийся в *пара*-положении к атому фтора, в структуре ЛВ имеет зафиксированное циклом окружение, что препятствует его инверсии и увеличивает вероятность вовлечения неподеленной электронной пары в сопряжение ароматического остова, аналогичным образом отражающееся на гидрофильности ФХ. Следует отметить, что более гидрофобные лекарства имеют большее сродство к ЧСА [9], поэтому следует ожидать, что ЦФ будет сильнее взаимодействовать с альбумином. Также важно подчеркнуть, что в условиях, близких к физиологическим (0.01 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7.4), ФХ находятся в растворе в форме цвиттер-ионов, т.к. имеют на противоположных концах молекул функциональные группы, зависящие от pH среды [17, 18].

Комплексообразование между ФХ и ЦД происходит за счет погружения ароматического остова лекарственной молекулы в полость ЦД, при этом положительно заряженный при pH 7.4 пиперазиновый фрагмент остается снаружи [6], а карбоксильная группа становится менее доступной для взаимодействия с другими лигандами. При комлексообразовании ФХ с ЦД морфолиновый фрагмент в структуре ЛВ способствует более полному погружению лекарственной молекулы в полость ЦД, чем в случае ЦФ. При этом анионная группа ЛВ оказывается снаружи молекулы-хозяина. По этой причине карбоксильные группы в молекулах ФХ экранированы по-разному. Данный факт может оказывать значительное влияние на связывание комплексов ФХ–М-β-ЦД с ЧСА, т.к. именно кислотные, анионные лекарства имеют большее сродство к ЧСА [9, 12, 13].

Взаимодействие ЧСА с фторхинолонами и их комплексами с метил-β-циклодекстринами. Для изучения механизма взаимодействия ЧСА с лекарственными препаратами в работе были исследованы растворы комплексов ФХ с белком (двухкомпонентные системы), а также ФХ–ЦД с ЧСА (трехкомпонентные системы) методом флуоресцентной спектроскопии. Данный метод нашел широкое применение в изучении биологических систем, т.к. он обладает высокой чувствительностью, дает возможность исследовать несколько веществ в одной системе, позволяет работать с живыми клетками, имеет высокую скорость ответа и небольшой расход реагентов [19].

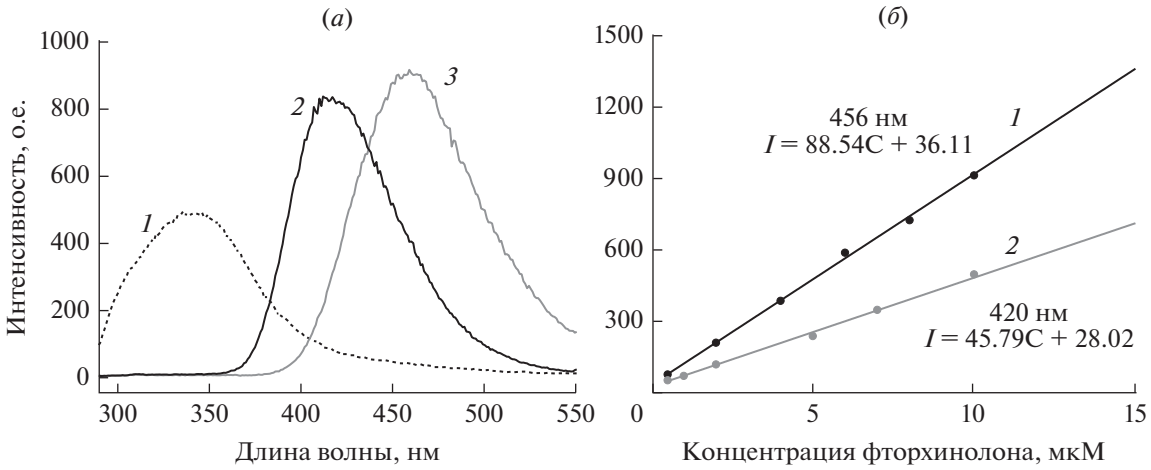

Рис. 3. (*а*) – Спектр эмиссии флуоресценции ЧСА (*1*), ципрофлоксацина (*2*) и левофлоксацина (*3*) в концентрациях 20, 10 и 10 мкМ соответственно (pH 7.4); (*б*) – калибровочные зависимости для левофлоксацина (*1*) и ципрофлоксацина (*2*).

Явление тушения флуоресценции белка может быть использовано для изучения связывания молекулы лекарственного средства с альбумином. В данной работе были изучены процессы взаимодействия ФХ и их комплексов с М-β-ЦД (в мольном соотношении ФХ : М-β-ЦД 1 : 1) с ЧСА.

В спектрах эмиссии флуоресценции ФХ при длине волны возбуждения 280 нм наблюдаются ярко выраженные пики с максимумами интенсивности, приходящимися на 456 и 420 нм для ЛВ и ЦФ соответственно (рис. 3*а*). Приведенные спектры эмиссии флуоресценции обусловлены наличием в структуре лекарственных молекул ароматических фрагментов. Для максимумов эмиссии ЛВ (λ_{max} = 456 нм) и ЦФ (λ_{max} = 420 нм) были получены градуировочные зависимости (рис. 3*б*) [20]. Важно отметить, что при концентрациях ФХ > 50 мкМ наблюдается концентрационное тушение флуоресценции.

Спектр эмиссии флуоресценции ЧСА имеет выраженный максимум интенсивности при длине волны 345 нм, обусловленный наличием ароматических аминокислотных остатков (Trp, Tyr) в белке. Поскольку спектры испускания ФХ и ЧСА практически полностью разрешены, то состояния анализируемых веществ могут быть одновременно изучены в двухкомпонентной системе.

С целью исследования комплексообразования ФХ с ЧСА были получены спектры эмиссии флуоресценции растворов, содержащих изучаемые вещества в широком диапазоне соотношений – от 1 : 0.5 до 1 : 20 (рис. 4*а*). В присутствии антибактериальных препаратов наблюдается снижение интенсивности спектра флуоресценции альбумина, что, вероятно, обусловлено изменениями в микроокружении ароматических остатков белка за счет взаимодействия ЧСА с ФХ. Практически полное исчезновение пика эмиссии флуоресценции альбумина происходит при мольном избытке ЦФ, равном 1, для ЛВ максимальное тушение наблюдается при мольном избытке, равном 5 (рис. 4*б*) [20]. Поскольку более существенные изменения присущи более гидрофобному лекарству – ЦФ, есть основания полагать, что основной механизм взаимодействия ЧСА с ФХ – гидрофобные взаимодействия. Это согласуется с литературными данными о том, что два главных сайта связывания альбумина IIA и IIIA имеют гидрофобные полости, предпочтительные для взаимодействия с гидрофобными молекулами. Например, в работе Ghuman et al. [21] был изучен механизм связывания оксифенбутазона, фенилбутазона, варфарина с ЧСА и установлено, что лекарственные молекулы занимают центр гидрофобной полости в сайте связывания IIA.

Важно отметить, что положение максимума ЧСА смещается в длинноволновую область на 10 нм в присутствии ФХ. Это может свидетельствовать о том, что связывание ФХ в белке приводит к конформационным изменениям в пространственной структуре альбумина и образованию более гидрофильного окружения его поверхности [22], что говорит о наличии электростатических взаимодействий между заряженной поверхностью ЧСА и молекулами ФХ, присутствующими в растворе в виде цвиттер-ионов. Данный механизм взаимодействия с белком превалирует в случае ЛВ, гидрофильные свойства которого выше, чем у ЦФ.

Зависимость тушения эмиссии флуоресценции ЧСА от концентрации ФХ может быть описана с помощью графиков Штерна–Фольмера, которые выражают зависимость F_0/F от концентрации тушителя (рис. 4*в*). Данные уравнения позволяют получить ценную информацию о ко-

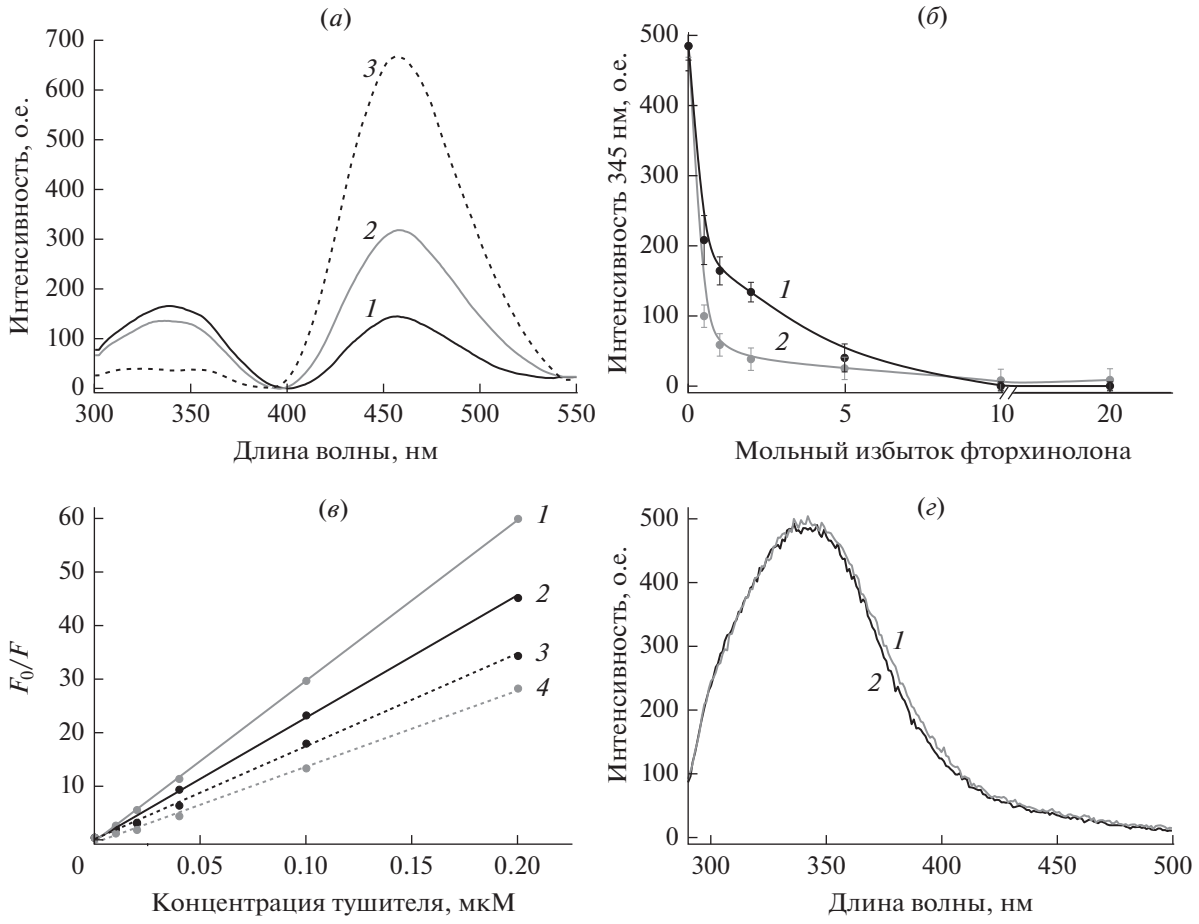

Рис. 4. (*а*) – Спектры флуоресценции системы ЧСА–левофлоксацин при мольном избытке лекарства, равном 0.5 (*1*), 1 (*2*) и 5 (*3*); (*б*) – изменение интенсивности максимума пика флуоресценции ЧСА в присутствии левофлоксацина (*1*) и ципрофлоксацина (*2*), 0.01 М натрий-фосфатный буферный раствор (pH 7.4); (*в*) – зависимости Штерна–Фольмера, выражающие эффект тушения эмиссии ЧСА F_0/F (345 нм) от концентрации ципрофлоксацина (*1*), левофлоксацина (*2*), комплекса левофлоксацина (*3*) и ципрофлоксацина (*4*) с метил-β-циклодекстрином (соотношение 1 : 1); (*г*) – спектр эмиссии флуоресценции системы ЧСА–метил-β-циклодекстрин (20 и 200 мкМ соответственно) (*1*) и ЧСА (20 мкМ, pH 7.4) (*2*).

личественном соотношении эффекта тушения эмиссии белка и концентрации присутствующего тушителя. Поскольку константа Штерна–Фольмера для ЦФ ($(2.9 \pm 0.2) \times 10^5$) больше, чем для ЛВ ($(2.2 \pm 0.2) \times 10^5$), ЦФ – более эффективный комплексообразователь для ЧСА по сравнению с ЛВ.

Комплексообразование М-β-ЦД с ФХ способно существенным образом влиять на эффективность связывания лекарства с белком за счет экранирования части молекулы лекарства, кроме того, в случае комплекса может изменяться сайт связывания ФХ в альбумине за счет изменения полярности молекулы лиганда. В работе Yan et al. [23] было показано, что свободный М-β-ЦД, в отличие от ФХ, незначительно увеличивает интенсивность флуоресценции ЧСА. В независимом эксперименте установлено, что М-β-ЦД практически не оказывает влияния на спектр эмиссии флуоресценции ЧСА (рис. 4*г*). Следовательно, М-β-ЦД не вносит значительных изменений в микроокружение ароматических аминокислотных остатков альбумина, в отличие от ФХ. Таким образом, можно говорить о различных механизмах взаимодействия М-β-ЦД и ФХ с белком.

Также в работе Yan et al. [23] было продемонстрировано, что в трехкомпонентной системе ЧСА–(арипипразол–М-β-ЦД) наблюдалось менее выраженное тушение в спектре эмиссии белка, нежели в двухкомпонентной системе ЧСА–арипипразол. Изучение влияния комплексообразования ФХ с М-β-ЦД на интенсивность флуоресценции ЧСА продемонстрировало следующие результаты: увеличение концентрации комплексов ФХ–М-β-ЦД вызывает тушение флуоресценции альбумина, однако насыщение для обоих ФХ происходит лишь при десятикратном мольном избытке, в отличие от двухкомпонентных систем ФХ–ЧСА, для которых насыщение наблюдается уже при пятикратном моль-

Таблица 1. Значения констант диссоциации (K_d) для комплексов фторхинолонов с метил-β-циклодекстрином и констант Штерна–Фольмера ($K_{ШФ}$) для комплексов фторхинолонов с ЧСА и трехкомпонентных систем (фторхинолон, метил-β-циклодекстрин и белок), pH 7.4

Фторхинолон	K_d (ФХ–М-β-ЦД) [6, 8]	$K_{ШФ}$ (ФХ–ЧСА)	$K_{ШФ}$ (ФХ–М-β-ЦД–ЧСА)
Ципрофлоксацин	$(7.7 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	$(2.9 \pm 0.2) \times 10^5$	$(1.4 \pm 0.3) \times 10^5$
Левофлоксацин	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	$(2.2 \pm 0.2) \times 10^5$	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^5$

ном избытке. Количественная характеристика снижения силы взаимодействия ФХ с белком в присутствие М-β-ЦД – уменьшение значений констант Штерна–Фольмера для трехкомпонентных систем. В случае ЦФ происходит значительное снижение константы – $(1.4 \pm 0.3) \times 10^5$ для системы ЧСА–(М-β-ЦД–ЦФ), что в 2 раза меньше по сравнению с аналогичной величиной для свободного ФХ. Для ЛВ изменение значения константы Штерна–Фольмера ($(1.8 \pm 0.4) \times 10^5$ для системы ЧСА–(М-β-ЦД–ЛВ)) не столь существенно (табл. 1). Известно, что комплексообразование ФХ с М-β-ЦД происходит за счет погружения ароматического остова ФХ в гидрофобную полость ЦД, при этом отрицательно заряженная карбоксильная группа ФХ становится недоступной для взаимодействия с альбумином, для которого характерно связывание с кислотными отрицательно заряженными молекулами. Таким образом, можно говорить, что М-β-ЦД может препятствовать взаимодействию ФХ с ЧСА или же приводить к изменению механизма связывания, при этом оказывая более выраженное влияние на ЦФ.

Важно отметить, что в случае систем, содержащих свободный ФХ с белком, более выраженное тушение вызывает ЦФ. При введении в раствор М-β-ЦД картина влияния ФХ на интенсивность флуоресценции ЧСА меняется на противоположную: более ярко эффект тушения можно наблюдать в системе, содержащей ЛВ. Как было отмечено ранее, более полное погружение молекулы ФХ в полость М-β-ЦД реализуется в случае комплексообразования с ЛВ, при этом карбоксильная группа ФХ оказывается доступной для взаимодействия с ЧСА. Напротив, молекула ЦФ не способна настолько глубоко входить в гидрофобную полость М-β-ЦД, что обусловливает меньшую доступность его кислотной группы для внешних взаимодействий и, как следствие, приводит к уменьшению связывания ЦФ с белком.

КД-спектроскопия. Для изучения изменений во вторичной структуре ЧСА, происходящих при взаимодействии альбумина с ФХ и их комплексами с ЦД, был использован метод кругового дихроизма (КД). Поскольку во вторичной структуре альбуминов в основном присутствуют α-спирали [10], то, как и следовало ожидать, негативные максимумы в КД-спектре наблюдаются при 208 и 220 нм, соответствующие π–π*-переходам пептидной связи в α-спиралях [24, 25]. Доля α-спиралей в свободном ЧСА при pH 7.4 составляет ~64%, что согласуется с литературными данными [26, 27]. Спектры свободных ФХ и М-β-ЦД в изучаемом нами диапазоне (200–260 нм) в концентрации 20 мкМ имеют очень низкую интенсивность, следовательно, изменения в спектре ЧСА будут вызваны лишь взаимодействием лекарственных формуляций с белком, а не “суперпозицией” спектров. Это позволяет изучать данную многокомпонентную систему с точки зрения влияния комплексообразования на конформацию ЧСА.

Взаимодействие белка с лекарственными формуляциями приводит к изменениям во вторичной структуре белка. При взаимодействии ФХ с ЧСА доля α-спиралей во вторичной структуре белка уменьшается (на ~9–12%) за счет увеличения доли неупорядоченных структур, а также увеличивается вклад β-листов [26]. Стоит отметить, что такие изменения выражены в большей степени в системе, содержащей более гидрофобную молекулу ЦФ, что согласуется с данными, полученными методом флуоресцентной спектроскопии (табл. 2). Такие результаты позволяют полагать, что взаимодействия между альбумином и ФХ в основном гидрофобные.

Аналогичные изменения происходят в двухкомпонентной системе, содержащей ЧСА и М-β-ЦД, но они менее выражены (доля α-спиралей уменьшается на ~6%), это также согласуется с данными, полученными методом флуоресцентной спектроскопии в работе Yan et al. [23].

В трехкомпонентных системах ЧСА–(ФХ–М-β-ЦД) происходят не столь выраженные изменения во вторичной структуре белка (доля α-спиралей снизилась всего на ~3–5% по сравнению со свободным ЧСА). В этих системах структура белка наиболее приближена к наблюдаемой у свободного ЧСА, т.е. М-β-ЦД стабилизирует исходную конформацию альбумина. К аналогичным выводам приходят Yan et al. [23] и Anand et al. [28], анализируя влияние β-циклодекстринов на взаимодействие лекарственных препаратов с ЧСА и бычьим сывороточным альбумином. Таким образом, можно говорить, что в трехкомпонентной системе М-β-ЦД блокирует связывание ФХ с ЧСА или, что наиболее вероятно, происходит из-

Таблица 2. Влияние фторхинолонов и метил-β-циклодекстрина на вторичную структуру ЧСА (pH 7.4, 25°C)

Система	Способ укладки, %				
	α-спирали	β-повороты	β-параллельные	β-антипараллельные	неупорядоченные
ЧСА	64 ±3	12 ± 1	4.8 ± 0.5	2.3 ± 0.3	16 ± 1
ЧСА–ЛВ (1 : 1)	55 ± 2	15 ± 1	5.2 ± 0.5	4.2 ± 0.5	22 ± 1
ЧСА–ЦФ (1 : 1)	52 ± 2	14 ± 1	5.1 ± 0.5	3.5 ± 0.3	23 ± 1
ЧСА–М-β-ЦД (1 : 1)	57 ± 2	14 ± 1	5.1 ± 0.5	3.6 ± 0.3	20 ± 1
ЧСА–ЦФ–М-β-ЦД (1 : 1 : 1)	61 ± 3	13 ± 1	5.0 ± 0.5	2.9 ± 0.3	18 ± 1
ЧСА–ЛВ–М-β-ЦД (1 : 1 : 1)	58 ± 2	14 ± 1	5.1 ± 0.5	3.5 ± 0.3	20 ± 1

Примечание: согласно литературным данным, содержание α-спиралей в ЧСА составляет 58–67% [24, 27, 31].

менение механизма или сайта связывания в альбумине. Наименьшие изменения во вторичной структуре белка наблюдаются в системе, содержащей ЦФ, что согласуется с данными, полученными методом флуоресцентной спектроскопии, и объясняется менее полным погружением ЦФ в гидрофобную полость ЦД.

Кинетика высвобождения фторхинолонов. Важная характеристика лекарственного средства – его фармакокинетика, а взаимодействие с белком может оказывать существенное влияние на данный параметр препарата. Поэтому была исследована кинетика высвобождения лекарственной молекулы из комплекса с ЧСА методом равновесного диализа с применением УФ-спектроскопии. В эксперименте размер пор мембраны (масса отсечения 3.5 кДа) был подобран таким образом, чтобы происходило высвобождение во внешний раствор только низкомолекулярного ФХ.

Методом УФ-спектроскопии были исследованы растворы индивидуальных веществ (ФХ и ЧСА). Спектры ФХ имеют ярко выраженную полосу поглощения с максимумом интенсивности при длине волны 287 и 271 нм для ЛВ и ЦФ соответственно, что обусловлено π–π*-переходами ароматического остова ФХ (рис. 5). Данные пики аналитически значимы для исследования содержания препаратов в растворе. Основная полоса поглощения ЧСА в УФ-диапазоне имеет максимум при длине волны 278 нм, соответствующий π–π*-переходам [29] остатков ароматических аминокислот белка.

Установлено, что в условиях, близких к физиологическим (pH 7.4, 37°C), более 80% ФХ высвобождается за 45 мин. Комплексообразование ФХ с М-β-ЦД (1 : 1) приводит к незначительному уменьшению скорости высвобождения лекарственных молекул на начальном временном участке.

Поскольку, как было показано ранее, наиболее эффективное связывание ФХ наблюдается при высоких мольных избытках лекарства относительно альбумина (в случае высокой локальной концентрации), то взаимодействие ФХ с белком в данных условиях должно приводить к существенному замедлению высвобождения лекарства. Действительно, при рассмотрении профиля высвобождения ЦФ (рис. 6) обнаружено, что связывание ЦФ с белком приводит к высвобождению 80% ЦФ за 120 мин (в 2.5 раза дольше по сравнению со свободным ЦФ). Менее выраженное влияние ЧСА оказывает на кинетику высвобождения ЛВ: за 60 мин высвобождается менее 80%, вероятная причина этого – меньшее сродство ЧСА к ЛВ в сравнении с ЦФ, что было рассмотрено выше (табл. 2). Поскольку поглощение печенью и клубочковая фильтрация прямо пропорциональны содержанию свободного лекарства, присутствующего в плазме [30], то образование комплексов альбумина с ФХ будет влиять на метаболизм и скорость выведения лекарства, т.к. взаимодействие с белком обусловливает постепенное высвобождение ФХ в плазму крови. Наиболее выраженное проявление данного эффекта будет наблюдаться при больших концентрациях ФХ, т.к.

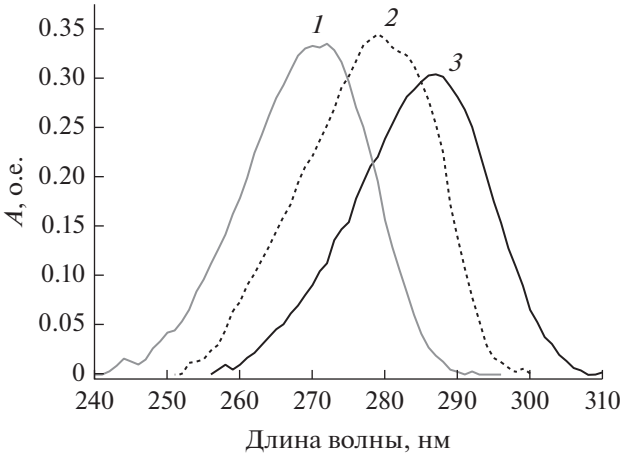

Рис. 5. УФ-спектры ципрофлоксацина (*1*), ЧСА (*2*) и левофлоксацина (*3*) в концентрациях 20 мкМ (pH 7.4).

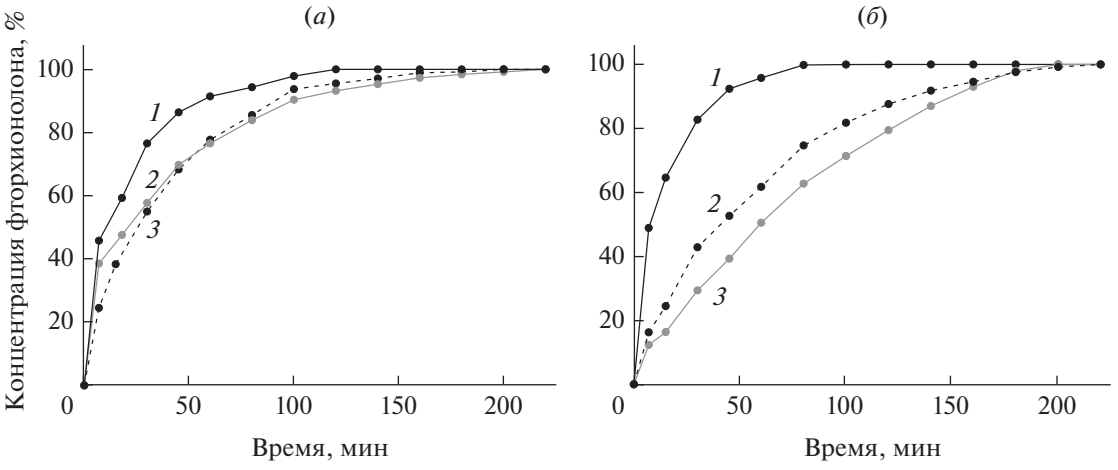

Рис. 6. (*а*) – Кинетика высвобождения левофлоксацина (*1*), левофлоксацина, связанного в комплекс с ЧСА (мольное соотношение ЛФ : белок 10 : 1) (*2*), а также левофлоксацина, связанного в комплекс с М-β-ЦД и ЧСА (мольное соотношение ЛФ : М-β-ЦД : белок 10 : 10 : 1) (*3*); (*б*) – кинетика высвобождения ципрофлоксацина (*1*), ципрофлоксацина, связанного в комплекс с ЧСА (мольное соотношение ЦФ : белок 10 : 1) (*2*), а также ципрофлоксацина, связанного в комплекс с М-β-ЦД и ЧСА (мольное соотношение ЦФ : М-β-ЦД : белок 10 : 10 : 1) (*3*), 0.01 М натрий-фосфатный буферный раствор (pH 7.4), 37°C.

насыщение центров связывания альбумина происходит при мольном избытке лекарства, равном 5. Препараты, связанные с белками плазмы, не могут подвергаться клубочковой фильтрации, в результате чего увеличивается период полувыведения лекарств, которые плохо секретируются почечными канальцами и медленно метаболизируются в печени, что обусловливает пролонгированность действия таких препаратов [9, 30, 31].

Кривые высвобождения ФХ из трехкомпонентных систем (соотношение компонентов ФХ : М-β-ЦД : ЧСА составляет 10 : 10 : 1) имеют профили, аналогичные описанным выше для двухкомпонентных систем (табл. 3). Наблюдается более выраженное влияние белка на ЦФ: по истечении 120 мин высвобождается менее 80% препарата (в 2.75 раза дольше по сравнению со свободным ЦФ). В случае ЛВ комплексообразование с М-β-ЦД в присутствии ЧСА приводит к менее существенному замедлению кинетики высвобождения ФХ, что может быть обусловлено изменением механизма взаимодействия ФХ с ЧСА из-за присутствия М-β-ЦД.

Приведенные результаты подтверждают данные, полученные методом флуоресценции и кругового дихроизма: даже при небольшом мольном избытке ЧСА (1 : 1) наблюдается более сильное изменение физико-химических параметров ЦФ, чем ЛВ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использовали метил-β-циклодекстрин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, сывороточный альбумин человека (Sigma-Aldrich, США); HCl (Реахим, Россия); фосфатный буфер (ЭКО-Сервис, Россия).

Получение комплексов ЧСА с фторхинолонами. К раствору ЧСА в фосфатном буфере (pH 7.4) добавляли требуемое количество раствора ФХ с тем же pH и доводили объем до 1 мл. Концентрацию ЧСА (60 мкМ) поддерживали постоянной во всех образцах, мольный избыток ФХ варьировали в интервале 0.5–20.0. Комплексы инкубировали при постоянном перемешивании и температуре 37°C, с использованием термостатируемого шейкера (Shaker-Incubator ES-20, BioSan, Латвия).

Таблица 3. Значение тангенсов угла наклона кривых высвобождения фторхинолонов (pH 7.4, 37°C)

Система	tg(α)	
	левофлоксацин	ципрофлоксацин
ФХ	3.50 ± 0.04	3.75 ± 0.04
ФХ–ЧСА (10 : 1)	1.55 ± 0.02	1.20 ± 0.01
ФХ–М-β-ЦД–ЧСА (10 : 10 : 1)	1.45 ± 0.02	0.80 ± 0.01

Примечание: значения выражены в процентном количестве свободного фторхинолона (%) от времени (мин).

Для изучения взаимодействия ЧСА и ЦФ с помощью УФ- и флуоресцентной спектроскопии были приготовлены растворы с концентрацией ЧСА 20 мкМ путем разбавления исходных образцов в 3 раза.

Получение комплексов фторхинолонов с метил-β-циклодекстрином. К раствору 34 мМ ФХ (pH 4.0) добавляли требуемое количество 30 мМ раствора М-β-ЦД в HCl (pH 4.0) для получения комплекса 1 : 1. Комплекс инкубировали в течение 1 ч при 37°C. При добавлении комплекса к раствору ЧСА систему переводили в pH 7.4 фосфатным буфером.

Получение систем ЧСА с комплексом ФХ с М-β-ЦД. К раствору ЧСА в фосфатном буфере (pH 7.4) добавляли требуемое количество раствора комплекса ФХ–М-β-ЦД, который разбавляли раствором фосфатного буфера для получения необходимой концентрации. Была приготовлена серия комплексов, концентрацию ЧСА (60 мкМ) поддерживали постоянной во всех образцах, мольный избыток ФХ варьировали в интервале 0.5–20.0 для каждой серии. Комплексы инкубировали при перемешивании при 37°C. Таким же образом была получена аналогичная серия комплексов с концентрацией ЧСА 20 мкМ путем разбавления исходных растворов в 3 раза.

Кинетика высвобождения ципрофлоксацина. Исследуемый образец (1 мл, концентрация комплексов 20 мкМ) помещали в диализный мешок (MWCO 3.5 кДа, Orange Scientific, Бельгия), высвобождение происходило во внешний раствор фосфатного буфера (pH 7.4) объемом 1 мл. Систему инкубировали при температуре 37°C и 150 об/мин, периодически отбирая аликвоты (50 мкл) для регистрации УФ-спектров.

УФ-спектры регистрировали на спектрометре УФ- и видимого диапазона Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences, США) трижды в интервале 200–400 нм в кварцевой кювете (Hellma Analytics, Германия). Исходные образцы разбавляли буферным раствором (pH 7.4) до концентрации ФХ 20 мкМ.

Флуоресцентная спектроскопия. Измерение флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, США), спектры флуоресценции регистрировали при температуре (25 ± 0.1)°C в кювете длиной 1 см. Спектры эмиссии измеряли при длине волны возбуждения 280 нм в диапазоне 290–555 нм с шагом 1 нм. Концентрацию белка поддерживали постоянной (20 мкМ, фосфатный буфер pH 7.4), концентрацию ФХ варьировали в диапазоне 10–200 мкМ.

Спектры кругового дихроизма регистрировали с помощью спектрометра J-815 (Jasco, Япония), оснащенного термостатируемой ячейкой. Измерения проводили в диапазоне длин волн 200–260 нм при 25°C в кварцевой кювете (длина 1 мм). Спектры получали пятикратным сканированием с шагом 1 нм. Обработку спектров проводили с помощью CD Spectroscopy Deconvolution Software (CDNN program version 2, Dr. Gerald Böhm, Magdeburg), используя для деконволюции и анализа 33 базовых спектра.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые исследовано влияние структуры фторхинолонов и комплексообразования ФХ с М-β-ЦД на взаимодействие лекарственной формуляции с ЧСА. Установлено, что химическая структура ФХ значительным образом влияет на связывание лекарственной молекулы с ЧСА, а также сказывается на различном влиянии М-β-ЦД на эти взаимодействия.

Методами КД и флуоресцентной спектроскопии было показано, что более гидрофобная молекула ЦФ сильнее взаимодействует с ЧСА, чем сходная ей молекула ЛВ, имеющая в своей структуре морфолиновый фрагмент вместо циклопропанила в *пара*-положении атома фтора. Так, методом флуоресцентной спектроскопии было установлено, что присутствие ЦФ обусловливает более выраженное тушение спектра эмиссии белка ($K_{ШФ}$ (ЦФ–ЧСА) = (2.9 ± 0.2) × 10^5), чем ЛВ ($K_{ШФ}$ (ЛВ–ЧСА) = (2.2 ± 0.2) × 10^5). С помощью метода КД-спектроскопии было показано, что ЛВ оказывает меньшее влияние на вторичную структуру белка, чем ЦФ. Это дает основания полагать, что связывание ФХ с ЧСА происходит в том числе и за счет гидрофобных взаимодействий.

Продемонстрировано уменьшение констант Штерна–Фольмера и влияния лекарственных формуляций на вторичную структуру альбумина при взаимодействии ЧСА с ФХ, связанных в комплекс с М-β-ЦД. Данный эффект сильнее проявляется в системе, содержащей ЦФ, что, по всей видимости, объясняется погружением молекулы ФХ в гидрофобную полость М-β-ЦД, приводящим к блокированию карбоксильной группы и ароматического остова ЦФ для взаимодействия с ЧСА. Напротив, в случае комплексообразования М-β-ЦД с ЛВ, благодаря наличию морфолинового фрагмента в структуре ФХ, анионная группа ЛВ оказывается снаружи молекулы-хозяина, что обусловливает ее доступность для связывания с ЧСА. Из этого можно сделать вывод, что именно карбоксильные группы молекул обеспечивают взаимодействие лекарств с альбумином. Данные выводы согласуются с тем, что ЧСА преимущественно взаимодействует с анионными кислотными молекулами [9]. Образование комплекса ФХ–М-β-ЦД приводит к изменению механизма взаимодействия препарата с ЧСА и оказывает

влияние на скорость высвобождения данных систем из модельной диализной мембраны. Следовательно, комплексообразование может приводить к изменению фармакокинетических и фармакодинамических свойств ФХ. Таким образом, впервые была установлена роль М-β-ЦД во взаимодействиях лекарственных молекул с ЧСА.

Данные результаты представляют большой интерес для создания систем доставки лекарственных препаратов с контролируемой скоростью высвобождения. Комплексообразование с ЧСА позволяет варьировать физико-химические свойства молекул, что дает возможность управлять фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами лекарства, способствовать уменьшению проявления побочных эффектов, увеличению активности лекарственных молекул, что крайне важно для планирования грамотной терапии с длительным применением антибактериальных препаратов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Van Bambeke F., Michot J.-M., Van Eldere J., Tulkens P.M.* // Clin. Microbiol. Infect. 2005. V. 11. P. 256–280. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01131.x
2. *Talley J.H.* // Postgrad. Med. 1991. V. 89. P. 101–113. https://doi.org/10.1080/00325481.1991.11700788
3. *Wolfson J.S., Hooper D.C.* // Clin. Microbiol. Rev. 1989. V. 2. P. 378–424. https://doi.org/10.1128/CMR.2.4.378
4. *Campoli-Richards D.M., Monk J.P., Price A., Benfield P., Todd P.A., Ward A.* // Drugs. 1988. V. 35. P. 373–447. https://doi.org/10.2165/00003495-198835040-00003
5. *Скуредина А.А., Ле-Дейген И.М., Упоров И.В., Кудряшова Е.В.* // Коллоидный журнал. 2017. № 5. P. 627–635. https://doi.org/10.7868/s0023291217050135
6. *Skuredina A.A., Kopnova T.Y., Le-Deygen I.M., Kudryashova E.V.* // Moscow Univ. Chem. Bull. 2020. V. 75. P. 218–224. https://doi.org/10.3103/S0027131420040069
7. *Скуредина А.А., Ле-Дейген И.М., Кудряшова Е.В.* // Коллоидный журнал. 2018. № 3. P. 330–337. https://doi.org/10.7868/s0023291218030102
8. *Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Uporov I.V., Kudryashova E.V.* // Anal. Bioanal. Chem. 2017. V. 409. P. 6451–6462. https://doi.org/10.1007/s00216-017-0590-5
9. *Fanali G., di Masi A., Trezza V., Marino M., Fasano M., Ascenzi P.* // Mol. Aspects Med. 2012. V. 33. P. 209–290. https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002
10. *He X.M., Carter D.C.* // Nature. 1992. V. 358. P. 209–215. https://doi.org/10.1038/358209a0
11. *Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M.* // Protein Eng. 1999. V. 12. P. 439–446. https://doi.org/10.1093/protein/12.6.439
12. *Varshney A., Ansari Y., Zaidi N., Ahmad E., Badr G., Alam P., Khan R.H.* // Cell Biochem. Biophys. 2014. V. 70. P. 93–101. https://doi.org/10.1007/s12013-014-9863-1
13. *Varshney A., Sen P., Ahmad E., Rehan M., Subbarao N., Khan R.H.* // Chirality. 2010. V. 22. P. 77–87. https://doi.org/10.1002/chir.20709
14. *Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N.* // Mol. Pharmacol. 1975. V. 11. P. 824–832.
15. *Trynda-Lemiesz L.* // Bioorg. Med. Chem. 2004. V. 12. P. 3269–3275. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.073
16. *Davis R., Markham A., Balfour J.A.* // Drugs. 1996. V. 51. P. 1019–1074. https://doi.org/10.2165/00003495-199651060-00010
17. *Blokhina S.V., Sharapova A.V., Ol'khovich M.V., Volkova T.V., Perlovich G.L.* // Eur. J. Pharm. Sci. 2016. V. 93. P. 29–37. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.07.016
18. *Davis R., Bryson H.M.* // Drugs. 1994. V. 47. P. 677–700. https://doi.org/10.2165/00003495-199447040-00008
19. *Valeur B.* // Encyclopedia of Applied Spectroscopy. Publishing GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2009. P. 477–531.
20. *Скуредина А.А., Копнова Т.Ю., Якупова Л.Р., Ле-Дейген И.М., Кудряшова Е.В.* // Биотехнология. 2020. Т. 36. № 6. С. 24–29. https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-6-149-154
21. *Ghuman J., Zunszain P.A., Petitpas I., Bhattacharya A.A., Otagiri M., Curry S.* // J. Mol. Biol. 2005. V. 353. P. 38–52. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.075
22. *Кудряшова Е.В., Гладилин А.К., Левашов А.В.* // Усп. биол. химии. 2002. Т. 42. С. 257–294.
23. *Yan J., Wu D., Ma X., Wang L., Xu K., Li H.* // Carbohydr. Polym. 2015. V. 131. P. 65–74. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.037
24. *Poureshghi F., Ghandforoushan P., Safarnejad A., Soltani S.* // J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2017. V. 166. P. 187–192. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.09.046
25. *Zhang G., Ma Y.* // Food Chem. 2013. V. 136. P. 442–449. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.026

26. *Varlan A., Ionescu S., Hillebrand M.* // Luminescence. 2011. V. 26. P. 710–715. https://doi.org/10.1002/bio.1302

27. *Dockal M., Carter D.C., Rüker F.* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 3042–3050. https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3042

28. *Anand U., Mukherjee S.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2013. V. 15. P. 9375. https://doi.org/10.1039/c3cp50207d

29. *Kaur A., Khan I.A., Banipal P.K., Banipal T.S.* // Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 2018. V. 191. P. 259–270. https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.10.017

30. *Lindup W.E., Orme M.C.* // Br. Med. J. (Clin. Res. Ed). 1981. V. 282. P. 212–214. https://doi.org/10.1136/bmj.282.6277.1707-b

31. *Schmidt S., Gonzalez D., Derendorf H.* // J. Pharm. Sci. 2010. V. 99. P. 1107–1122. https://doi.org/10.1002/jps.21916

The Effect of Methyl-β-Cyclodextrin on the Interaction of Fluoroquinolones with Human Serum Albumin

L. R. Yakupova*, #, T. Yu. Kopnova*, A. A. Skuredina*, and E. V. Kudryashova*

#Phone: +7 (977) 713-21-54; e-mail: Yakupova.Linara@mail.ru

**Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia*

The influence of the structure of fluoroquinolones (on the example of ciprofloxacin and levofloxacin) and their complexation with methyl-β-cyclodextrin on the interaction of the drug with human serum albumin was studied. It was found that the binding of the drug molecule with albumin is significantly affected by the structure of fluoroquinolone, as well as the presence of methyl-β-cyclodextrin. It was discovered that of the two fluoroquinolones, the more hydrophobic ciprofloxacin molecule interacts more strongly with the protein, using circular dichroism and fluorescence spectroscopy methods. It has also been shown that binding of albumin to the drug causes quenching of protein fluorescence, and this effect is more pronounced for ciprofloxacin. The complexation of fluoroquinolones with methyl-β-cyclodextrin leads to a change in the mechanism of the interaction of fluoroquinolones with the protein: in the case of complexes, more pronounced interactions are observed for levofloxacin. The results obtained will help to bring the use of fluoroquinolones to a new level in clinical practice, by creating new highly effective drugs with improved properties.

Keywords: human serum albumin, fluoroquinolones, methyl-β-cyclodextrin, fluorescence spectroscopy