

УДК 615.456

Влияние физико-химических свойств фторхинолонов на их взаимодействие с человеческим сывороточным альбумином

© 2020 А.А. СКУРЕДИНА^{1*}, Т.Ю. КОПНОВА¹, Л.Р. ЯКУПОВА¹, И.М. ЛЕ-ДЕЙГЕН¹, Е.В. КУДРЯШОВА¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, 119991

*e-mail: skuredinanna@gmail.com

Поступила в редакцию 04.09.2020 г.

После доработки 21.10.2020 г.

Принята к публикации 15.11.2020 г.

Методом флуоресцентной спектроскопии на примере ципрофлоксацина и левофлоксацина показано, что фторхинолоны способны взаимодействовать с человеческим сывороточным альбумином даже при низких мольных соотношениях. Пятикратный мольный избыток фторхинолона приводит к тушению флуоресценции белка вплоть до ее полного исчезновения. На основе данных флуоресцентного анализа сделан вывод о взаимодействии белка с гидрофобным ципрофлоксацином преимущественно с помощью гидрофобных взаимодействий, а менее гидрофобного левофлоксацина за счет электростатических. Установлено, что кинетика высвобождения лекарства из комплекса белок–фторхинолон зависит от параметра гидрофобности Ганша соответствующего фторхинолона. Полученные результаты важны для рационального дизайна новых лекарственных молекул и прогнозирования их фармакокинетических параметров.

Ключевые слова: человеческий сывороточный альбумин, фторхинолоны, флуоресцентная спектроскопия

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-149-154

В современном мире инфекционные заболевания, возбудителями которых являются патогенные бактерии, представляют собой серьезную угрозу для человечества. В терапии инфекционных заболеваний, как правило, используются антибиотики и другие антибактериальные препараты, среди которых выделяется группа препаратов — фторхинолоны (ФХ).

Механизм антибактериального действия этих соединений основан на избирательном ингибировании ключевых ферментов, участвующих в процессе репликации ДНК. Прочно связываясь с ДНК-гиразой, ФХ останавливают рост бактерий, не оказывая влияния на синтез ДНК млекопитающих.

ФХ нашли широкое применение в медицинской практике благодаря широкому спектру активности (грамотрицательные и грамположительные аэробные и анаэробные бактерии, в том

числе *M. Tuberculosis*), химической и биологической стабильности, а также различным способам введения в организм (пероральное и парентеральное) [1]. Препараты на их основе применяются для лечения различных бактериальных инфекций, в частности кожных, урологических, гинекологических, офтальмологических, внутрибрюшных и внутрибольничных инфекций, а также тяжелых заболеваний дыхательных путей, таких как туберкулез. Однако, длительный курс лечения с применением высоких дозировок ФХ сопровождается развитием ряда побочных эффектов [2, 3]. Для решения данной проблемы требуется создание систем доставки, увеличивающих эффективность действия лекарства и уменьшающих их токсичность [4–6].

При разработке новых лекарственных форм ФХ необходимо учитывать взаимодействие активной молекулы с белками крови. Основным

Список сокращений: ЛВ — левофлоксацин; ФХ — фторхинолон; ЦФ — ципрофлоксацин; ЧСА — человеческий сывороточный альбумин; PBS — натрий-фосфатный буферный раствор.

белком плазмы крови человека является сывороточных альбумин (ЧСА). В организме ЧСА выполняет ряд важных функций, он является главным регулятором проницаемости капиллярных мембран и коллоидного осмотического давления плазмы. ЧСА связывает и транспортирует разнообразные молекулы, в том числе липидные метаболиты (холестерин, гормоны, жирные кислоты и др.) и экзогенные вещества (лекарственные средства и пищевые соединения). Помимо переноса связываемых белком молекул к почкам, кишечнику, печени и другим органам, ЧСА способствует поддержанию постоянного pH и осмотического давления, препятствует фотодеградациии фолиевой кислоты, является маркером воспалительных процессов [7].

Известно, что ФХ способны взаимодействовать с ЧСА посредством гидрофобных и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, а также водородных связей, в стереохимии 1:1. Наиболее чувствительным методом для анализа таких систем является флуоресцентная спектроскопия [8, 9]. В данной работе рассмотрено влияние физико-химических свойств ФХ ципрофлоксацина (ЦФ) и левофлоксацина (ЛВ) на механизм их взаимодействия с ЧСА и влияние связывания ФХ с белком на кинетику высвобождения из диализной мембраны, моделирующей биологические барьеры. Полученные результаты важны для выявления структурных особенностей малых лекарственных молекул, оказывающих наибольшее влияние на связывание с ЧСА, что необходимо для рационального дизайна новых лекарственных молекул и прогнозирования их фармакокинетических параметров.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реагенты: человеческий сывороточный альбумин, левофлоксацин — Sigma-Aldrich (США); ципрофлоксацин — «Канонфарма» (Россия); HCl — «Реахим» (Россия); Фосфатный буфер «ЭкоСервис» (Россия).

Получение комплексов человеческого сывороточного альбумина с фторхинолоном: к раствору 0,06 мМ белка в 0,01М натрий-фосфатном буферном растворе pH 7,4 (PBS) добавляли требуемое количество раствора 0,2 мМ ФХ в том же буферном растворе и доводили объем до 0,8 мл. Концентрация ЧСА поддерживалась постоянной во всех образцах и была равна 0,02 мМ, мольный избыток ФХ варьировался в интервале от 0,5 до 20. Смеси инкубировали при перемешивании и температуре 37 °С.

Исследование кинетики высвобождения фторхинолонов: 1,0 мл исследуемого образца

помещали в диализных мешок Orange Scientific (масса отсечения 3,5 кДа). Высвобождение происходило во внешний (PBS) объемом 1,0 мл. Систему инкубировали при температуре 37 °С и 150 об/мин на качалке, периодически отбирая аликвоты 50 мкл для регистрации УФ-спектров.

УФ-спектры регистрировали на спектрометре УФ- и видимого диапазона UltraSpec 2100 pro (AmerSharm Biosciences, Великобритания) трижды в интервале от 200 до 400 нм в кварцевой кювете (Hellma Analytics, Германия). Исходные образцы разбавлялись PBS до концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ М.

Спектры эмиссии флуоресценции регистрировали на флуоресцентном спектрометре Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, США). Спектры ФХ, ЧСА и систем белок-лекарство регистрировали при длине волны возбуждения 280 нм в интервале от 290 нм до 600 нм. Определяли интенсивность пика белка при 345 нм.

Определение ζ-потенциала осуществлялось методом динамического светорассеяния (DLS). Измерения проводили на оборудовании Zetasizer Nano S (Malvern Panalytical, Великобритания) (4 мВт He-Ne-лазер, 633 нм) в термостатируемой ячейке при 25 °С. Автокорреляционные функции флуктуации интенсивности светорассеяния были получены с использованием корреляционной системы Correlator K7032-09 Malvern. Экспериментальные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения «Zetasizer Software» (Malvern Panalytical). ζ-потенциал вычисляли усреднением величин, полученных от трех независимых измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку ципрофлоксацин и левофлоксацин относятся к группе фторхинолонов, они имеют сходное химическое строение: хинолоновый ароматический остов с введенным в шестое положение фтором, карбонильная и карбоксильная группа, а также гетероцикл (рис. 1). В связи с присутствием pH чувствительных функциональных групп ФХ имеют разные состояния в зависимости от pH среды. В физиологических условиях (pH 7,4) молекулы ФХ представляют собой цвиттер-ионные соединения.

Помимо общих структурных фрагментов ЦФ и ЛВ имеют ряд отличий. В структуре ЦФ присутствует гидрофобное циклопропановое кольцо, а ЛВ содержит морфолиновый фрагмент, сочлененный с хинолоновым остовом. Таким образом, ЦФ является более гидрофобной молекулой, что обуславливает более низкий параметр

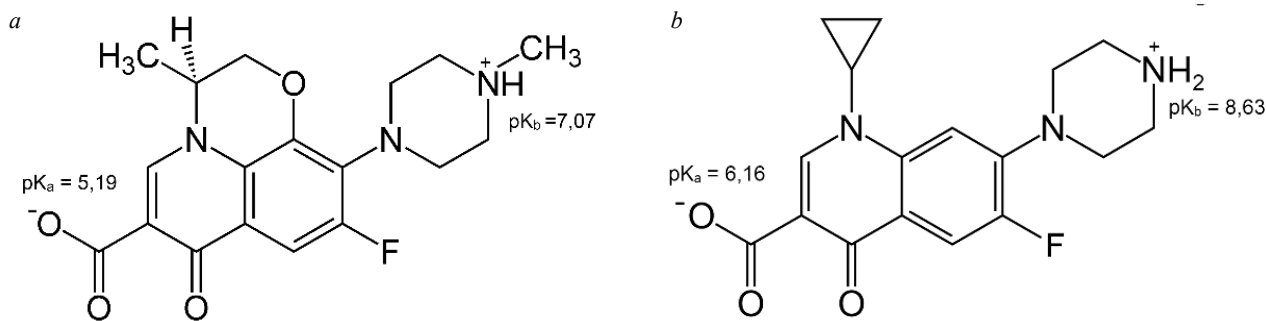


Рис. 1. Структурные формулы фторхинолонов левофлоксацина (а) и ципрофлоксацина (b) при pH 7,4.

Fig. 1. Structural formulas of fluoroquinolones levofloxacin (a) and ciprofloxacin (b) at pH 7,4.

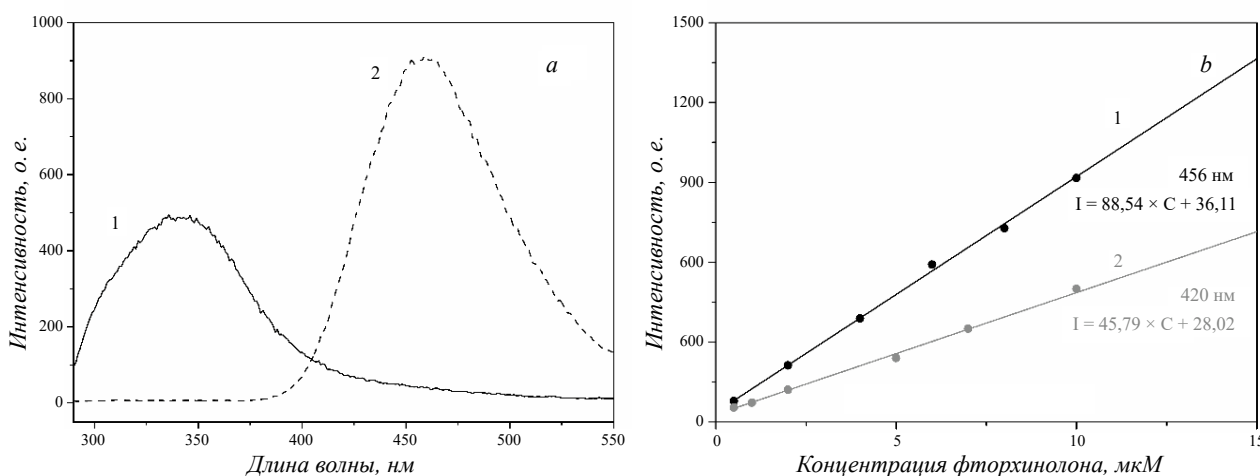


Рис. 2. (а). Спектр флуоресценции человеческого сывороточного альбумина (1) и левофлоксацина (2) в концентрациях 0,02 мМ и 0,01 мМ соответственно (pH 7,4), (b). Калибровочные зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации ФХ для левофлоксацина (1) и ципрофлоксацина (2).

Fig. 2. (a). Fluorescence spectra of 0,02 mM human serum albumin (1) and 0,01 mM levofloxacin (2) (pH 7.4), (b). Calibration curves of for levofloxacin (1) and ciprofloxacin (2).

гидрофобности Ганша (LogP). LogP определяется как логарифм распределения вещества между н-октаном и водным буфером, значение параметра варьируется в зависимости от pH буфера. Для pH 7,4 ФХ имеют параметры гидрофобности Ганша: $\text{LogP}_{\text{ЦФ}} = -0,88$ и $\text{LogP}_{\text{ЛВ}} = -0,25$ [10, 11].

Для исследования механизма взаимодействия ЧСА с ЦФ и ЛВ, а также влияния связывания ФХ на кинетику высвобождения лекарства из модельных диализных систем, были исследованы системы ЧСА–ФХ в различных мольных соотношениях.

Влияние связывания с фторхинолонами на спектр эмиссии флуоресценции ЧСА:

Флуоресцентная спектроскопия была выбрана в качестве основного метода исследования систем белок–лекарство, поскольку позволяет получить достоверные информативные результаты при исследовании образования комплексов

биомолекул, в том числе и белков, с различными лигандами [12, 13].

В спектре флуоресценции ЧСА присутствует широкий пик с максимумом при длине волны 345 нм, обусловленный триптофановым остатком Trp214 [7]. Спектры флуоресценции ЛВ и ЦФ имеют максимумы 420 нм и 456 нм, соответственно (рис. 2). Пики в спектрах флуоресценции фторхинолонов и ЧСА при одинаковых условиях (возбуждение при $\lambda_{\text{ex}} = 280$ нм) почти полностью разделяются, что позволяет одновременно анализировать состояния лекарства и белка в двухкомпонентной системе.

При исследовании влияния концентрации фторхинолонов на спектр флуоресценции белка были исследованы растворы с мольным избытком лекарств по отношению к ЧСА в диапазоне от 0,5 до 20. В присутствии обоих ФХ наблюдается падение интенсивности флуоресценции ЧСА (рис. 3), что, по-видимому, обусловлено

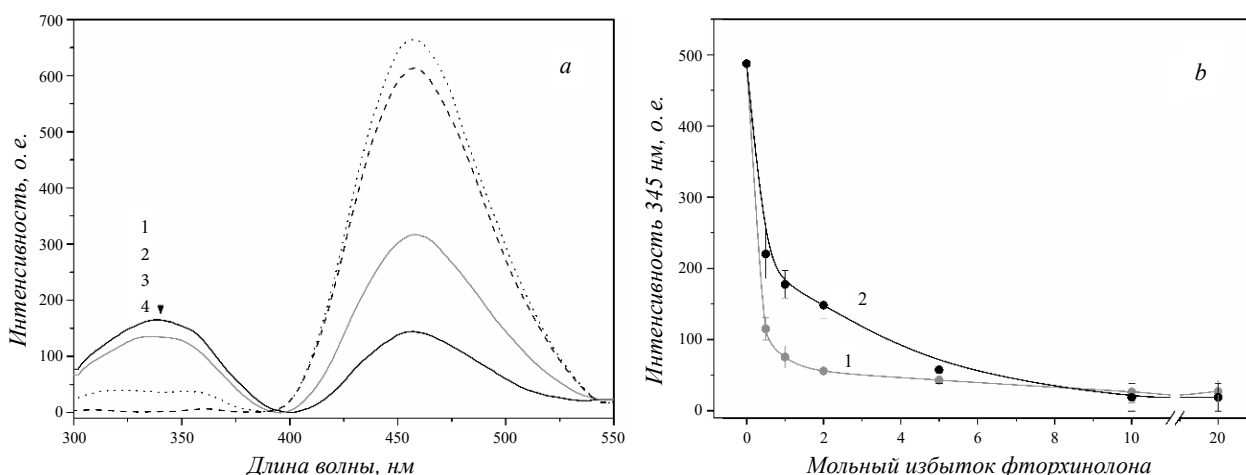


Рис. 3. (а) Спектры флуоресценции комплекса человеческого сывороточный альбумин — левофлоксацин при мольном избытке лекарства 0,5 (1), 1 (2), 5 (3) и 20 (4). (б). Изменение интенсивности флуоресценции человеческого сывороточного альбумина в PBS при 345 нм в зависимости от концентрации ципрофлоксацина (1) и левофлоксацина (2).

Fig. 3. (a) Fluorescence spectra of the human serum albumin — levofloxacin complex in drug molar excess 0,5 (1), 1 (2), 5 (3) and 20 (4). (b). The fluorescence intensity of human serum albumin in PBS at 345 nm depending on the concentration of ciprofloxacin (1) and levofloxacin (2).

изменениями в микроокружении Trp214 белка. Положение максимума флуоресценции ЧСА не изменяется в присутствии ФХ, что указывает на отсутствие значительных конформационных изменений в структуре белка [9, 14]. Необходимо отметить, что значительное падение интенсивности пика флуоресценции ЧСА наблюдается при небольших (0,5) мольных соотношениях ФХ:ЧСА, что свидетельствует о довольно прочном взаимодействии белка с лекарством.

Полное исчезновение пика ЧСА наблюдается при мольном соотношении с ЦФ равном 1:1 и при мольном избытке ЛВ равном 5 (рис.3б.). Согласно литературным данным, тушение флуоресценции белка в присутствии ряда лекарственных препаратов, в том числе и фторхинолонов, обусловлено именно гидрофобными контактами хромофора с фрагментами лекарственных молекул [15, 16]. Кроме того, поскольку наиболее сильные изменения характерны для более гидрофобного лекарства — ЦФ, то основным механизмом взаимодействия ЧСА с ФХ по-видимому является гидрофобные взаимодействия между ароматическим остовом ФХ и триптофановым остатком белка.

Влияние связывания с фторхинолонами на ζ -потенциал глобул ЧСА:

Для исследования электростатических взаимодействий между ФХ и поверхностью ЧСА был исследован ζ -потенциал комплекса белок-лекарство (рис. 4). ФХ при pH 7,4 являются цвиттер-ионными соединениями, их ζ -потенциал

близок к нулю, в то время как ζ -потенциал глобул ЧСА составляет $-10,3 \pm 1,1$ мВ, что позволяет предположить, что ФХ способны взаимодействовать с поверхностью белка за счет протонированного азота гетероцикла (рис. 1).

При возрастающих мольных избытках ЦФ наблюдается нейтрализация ζ -потенциал ЧСА от -10 до -6 мВ. Такой эффект может быть обусловлен перестройками внутри белка при встраивании ароматического остова ЦФ в глобулу ЧСА. В случае ЛВ наблюдается противоположный эффект — происходит снижение ζ -потенциала на 2 мВ, что может быть результатом повышения содержания $-\text{COO}^-$ групп на поверхности белка при связывании с избытком ЛФ.

Влияние связывания с ЧСА на кинетику высвобождения ФХ из модельных диализных систем:

Поскольку взаимодействие с белком может оказывать воздействие на фармакокинетику лекарства, было изучено влияние связывания фторхинолонов с ЧСА на кинетику высвобождения ЛВ и ЦФ методом равновесного диализа (при мольном соотношении лекарство : белок 1:1).

Установлено, что в условиях близких к физиологическим (PBS, pH 7,4; 37 °C) более 80% обоих фторхинолонов высвобождается за 45 мин (рис. 5). Взаимодействие ФХ с ЧСА должно приводить к замедлению высвобождения лекарства, что наблюдается для ЦФ: связывание с белком приводит к высвобождению 80% ЦФ за 120 мин. Однако ЧСА не оказывает

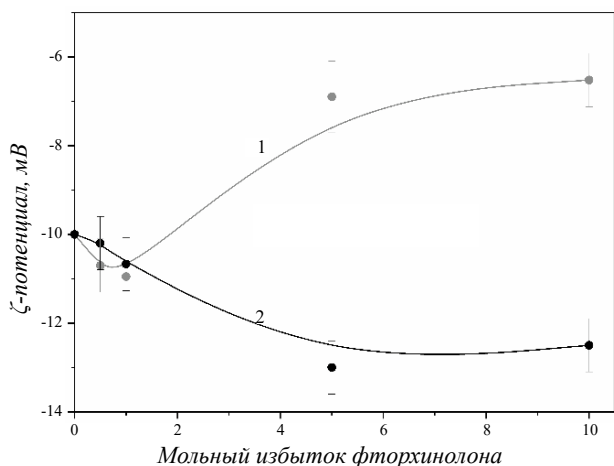


Рис. 4. Значения ζ -потенциала растворов человеческого сывороточного альбумина в PBS в присутствии мольного избытка ципрофлоксацина (1) и левофлоксацина (2).

Fig. 4. The ζ -potential of human serum albumin solutions in PBS in the presence of ciprofloxacin (1) and levofloxacin (2) molar excess.

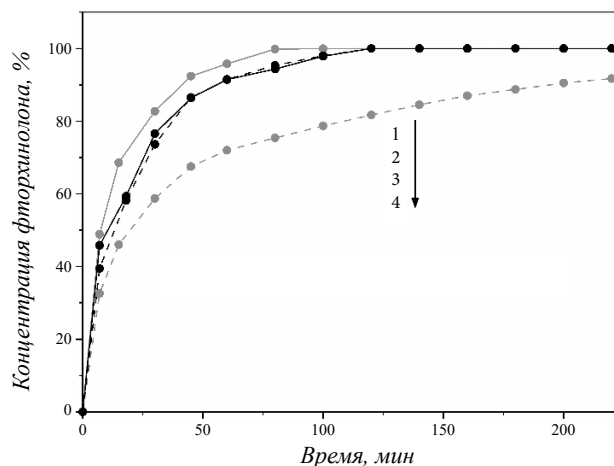


Рис. 5. Кинетика высвобождения ципрофлоксацина (1), левофлоксацина (2), а также ципрофлоксацина (4) и левофлоксацина (3), связанных в комплекс с человеческим сывороточным альбумином (мольное соотношение лекарство : белок = 1: 1) в PBS при 37 °С.

Fig. 5. The release kinetics of ciprofloxacin (1), levofloxacin (2), and ciprofloxacin (4) and levofloxacin (3) bounded to human serum albumin (molar ratio drug : protein 1: 1) in PBS at 37 °С.

влияние на кинетику высвобождения ЛВ, что по-видимому обусловлено его меньшим сродством к ЧСА, по сравнению с ЦФ.

Полученные результаты подтверждают данные, полученные методом флуоресценции: при мольном соотношении ЧСА:ФХ (1:1) наблюдается более сильное изменение физико-химических параметров комплекса ЧСА–ЦФ, чем ЧСА–ЛВ.

Фторхинолоны способны взаимодействовать с человеческим сывороточным альбумином даже при низких мольных соотношениях (ФХ:ЧСА= 0,5:1). В зависимости от физико-химических свойств фторхинолонов установлено два превалирующих взаимодействия с белком: для более гидрофобного ципрофлоксацина характерны преимущественные гидрофобные взаимодействия с триптофановыми остатками белка, а для менее гидрофобного левофлоксацина — электростатические на поверхности ЧСА. Наиболее сильные изменения в состоянии белка вносят гидрофобные взаимодействия, которые приводят к значительному изменению профиля высвобождения лекарства. Таким образом, наличие небольших гидрофобных фрагментов в молекуле лекарства обуславливает более эффективное взаимодействие с альбумином. Полученные результаты важны для разработки новых лекарственных молекул и прогнозирования их фармакокинетических параметров в зависимости от их структуры и физико-химических свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Appelbaum P.C., Hunter P.A. The fluoroquinolone antibacterials: Past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents*, 2000, 16, (1), 5–15. doi:10.1016/S0924-8579(00)00192-8
2. Fish D.N. Fluoroquinolone Adverse Effects and Drug Interactions. *Pharmacotherapy*, 2001, 21, (10 Part 2), 253–272. doi:10.1592/phco.21.16.253s.33993
3. Liu H.H. Safety profile of the fluoroquinolones: Focus on levofloxacin. *Drug Saf.*, 2010, 33, (5), 353–369. doi:10.2165/11536360-000000000-00000
4. Ле-Дейген И.М., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В. Системы доставки фторхинолонов: новые перспективы в борьбе с туберкулезом. *Биоорг.химия*, 2017, 43, (5), 464–480. doi:10.7868/S0132342317050086
5. Скуредина А.А., Ле-Дейген И.М., Упоров И.В. и др. Исследование физико-химических свойств и структуры комплекса моксифлоксацина с метил- β -циклодекстрином. *Коллоидный журнал*, 2017, 79, (5), 627–635. doi:10.7868/S0023291217050135
6. Скуредина А.А., Ле-Дейген И.М., Кудряшова Е.В. Влияние молекулярной архитектуры наночастиц сульфобутилового эфира β -циклодекстрина на физико-химические свойства комплексов с моксифлоксацином. *Коллоидный журнал*, 2018, 80, (3), 330–337. doi: 10.7868/S0023291218030102
7. Fanali G., Di Masi A., Trezza V. et al. Human serum albumin: From bench to bedside. *Mol Aspects Med.*, 2012, 33, (3), 209–290. doi:10.1016/j.mam.2011.12.002

8. Zhang L.W., Wang K., Zhang X.X. Study of the interactions between fluoroquinolones and human serum albumin by affinity capillary electrophoresis and fluorescence method. *Anal Chim Acta.*, 2007, 603, (1), 101–110. doi:10.1016/j.aca.2007.09.021
9. Seedher N., Agarwal P. Complexation of fluoroquinolone antibiotics with human serum albumin: A fluorescence quenching study. *J Lumin.*, 2010, 130, (10), 1841–1848. doi:10.1016/j.jlumin.2010.04.020
10. Blokhina S.V., Sharapova A.V., Ol'khovich M.V. et al. Solubility, lipophilicity and membrane permeability of some fluoroquinolone antimicrobials. *Eur J Pharm Sci.*, 2016, 93, 29–37. doi:10.1016/j.ejps.2016.07.016
11. Langlois M.H., Montagut M., Dubost J.P. et al. Protonation equilibrium and lipophilicity of moxifloxacin. *Eur J Pharm Biopharm Anal.*, 2005, 37, 389–393.
12. Kaur A., Khan I.A., Banipal P.K. et al. Deciphering the complexation process of a fluoroquinolone antibiotic, levofloxacin, with bovine serum albumin in the presence of additives. *Spectrochim Acta — Part A Mol Biomol Spectrosc.*, 2018, 191, 259–270. doi:10.1016/j.saa.2017.10.017
13. Thee S., Garcia-Prats A.J., Donald P.R. et al. Fluoroquinolones for the treatment of tuberculosis in children. *Tuberculosis*, 2015, 95, (3), 229–245. doi:10.1016/j.tube.2015.02.037
14. Xie M.X., Long M., Liu Y. et al. Characterization of the interaction between human serum albumin and morin. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.*, 2006, 1760, (8), 1184–1191. doi:10.1016/j.bbagen.2006.03.026
15. Bolattin M.B., Nandibewoor S.T., Joshi S.D. et al. Interaction of Hydralazine with Human Serum Albumin and Effect of β -Cyclodextrin on Binding: Insights from Spectroscopic and Molecular Docking Techniques. *Ind Eng Chem Res.*, 2016, 55, (19), 5454–5464. doi:10.1021/acs.iecr.6b00517
16. Paul B.K., Ghosh N., Mukherjee S. Interplay of Multiple Interaction Forces: Binding of Norfloxacin to Human Serum Albumin. *J Phys Chem B*, 2015, 119, (41), 13093–13102. doi:10.1021/acs.jpcc.5b08147

Influence of Physicochemical Properties of Fluoroquinolones on their Interaction with Human Serum Albumin

A.A. SKUREDINA^{1*}, T.Yu. KOPNOVA¹, L.R. YAKUPOVA¹, I.M. LE-DEYGEN¹, and E.V. KUDRYASHOVA¹

¹ Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia

*e-mail: skuredinanna@gmail.com

Received September 4, 2020

Revised October 21, 2020

Accepted November 15, 2020

Abstract—It has been shown on the example of ciprofloxacin and levofloxacin that fluoroquinolones are able to interact with human serum albumin even at low molar ratios. A fivefold molar excess of fluoroquinolone quenched the protein fluorescence until its completely disappeared. The data of fluorescent analysis led to the conclusion that the relationship between the protein and hydrophobic ciprofloxacin is based on hydrophobic bonds, while less hydrophobic levofloxacin interacts with serum albumin via electrostatics. It was established that kinetics of drug release from the protein–fluoroquinolone complex depends on the Ganesh hydrophobicity parameter of the antibiotic. The obtained results are important for the rational design of new drugs and the prediction of their pharmacokinetic characteristics.

Key words: human serum albumin, fluoroquinolones, fluorescent spectroscopy

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-149-154