УДК 577.322 : 615.33

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ С ГЕМОГЛОБИНОМ

Е. С. Баева, С. Г. Резван, В. Г. Артюхов

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 07.09.2012 г.

Аннотация. Представлены результаты исследования влияния антибактериальных препаратов различных классов на структурно-функциональные свойства гемоглобина человека. Установлено, что молекулярные комплексы изученных антибиотиков с оксигемоглобином характеризуются меньшей термоустойчивостью по сравнению с немодифицированным гембелком. Методом протолитометрического титрования выявлено, что степень активности антибиотиков в отношении ионогенных групп белка определяется их концентрацией и химической природой модификатора. Показано, что доксициклин, клиндамицин, а также антибиотики класса макролиды взаимодействуют преимущественно с карбоксильными группами остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот. Фторхинолоны (ципрофлоксацин и спарфлоксацин) комплексируют с карбоксильными группами белка; офлоксацин проявляет наибольшую активность по отношению к аминогруппам лизина и тирозина.

Ключевые слова: антибиотики, гемоглобин, тепловая денатурация, буферная емкость.

Abstract. The article under consideration presents the results of research of the influence of antibacterial substances of different nature on structurally functional properties of human haemoglobin. It was established that molecular complexes of the examined antibiotics with oxyhemoglobin are characterized by lower thermostability in comparison with unmodified protein. It was revealed by protolytic titration that the level of activity of antibiotics in relation to ionogenic groups is determined by their concentration and the chemical nature of the modifier. It was demonstrated that doxycycline, clindamycin as well as macrolide antibiotics interreact mostly with carboxyl groups of asparaginic and glutaminic acids. Fluoroquinolones (ciprofloxacin and sparfloxacin) interact with carboxyl groups of the proteins, while ofloxacin exhibits the highest activity rate with the amine groups of lysine and tyrosine.

Keywords: antibiotics, haemoglobin, thermodenaturation, buffer capacity.

ВВЕДЕНИЕ

Антибактериальные препараты, применяемые в терапии воспалительных процессов, обладают рядом лечебных и побочных эффектов [1—12]. В химическом отношении — это гетерогенные соединения, молекулы которых содержат почти все функциональные группы, известные в органической химии, а также имеют структуры, характерные для органических веществ [1, 3, 4, 7, 13]. Механизмы взаимодействия антибиотиков с клетками про- и эукариот различны [3, 9, 10, 14, 15]. Проникая в ткани и среды макроорганизма, они влияют на фагоцитарную активность макрофагов [1], агрегационные свойства тромбоцитов [11], изменяют структурно-функциональные свойства эритроцитов [16]. Принимая во внимание важность функциональной полноценности клеток, исследование взаимосвязей между структурными свойствами их компонентов и химической активностью антибиотиков представляется весьма актуальным.

© Баева Е. С., Резван С. Г., Артюхов В. Г., 2012

Цель нашей работы: изучить молекулярные механизмы, лежащие в основе взаимодействия антибиотиков различных классов с биомолекулами, на примере модельной системы антибиотик — гемоглобин человека.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

О характере внутримолекулярных перестроек, обусловленных суммарным вкладом гидрофобных, электростатических и других типов взаимодействий в системе «реагент-белок», судили по комбинированному влиянию температуры и антибиотиков на интенсивность светорассеяния образцов гемоглобина. В опытах применяли водные растворы белка в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, полученные по методу Д. Л. Драбкина с модификацией Л. А. Блюменфельда из эритроцитов донорской крови, предварительно инкубированных с антибактериальными препаратами (АБП) при 37°С в течение 1ч, путем их осмотического гемолиза [17]. Концентрацию растворов оксигемоглобина определяли спектрофотометрически [17]. Контрольный и опытный растворы термостатировали на водяной

бане типа LW-2 при 55 °С. Время их инкубации составляло 30 мин. Подвергнутые воздействию температуры белковые растворы охлаждали до комнатной температуры 23 °С. О термохимических превращениях глобина донорской крови мы судили по величине светорассеяния (τ), которая связана пропорциональной зависимостью с размерами и формой исследуемых частиц [17, 18]. Состояние последних оценивали косвенным методом: путем измерения светопропускания растворов контрольных и модифицированных антибиотиками образцов с последующим перерасчетом в величины светопоглощения. Опыты проведены с помощью фотоколориметра концентрационного КФК-3 при длине волны 490 нм, при которой коэффициент молярной экстинкции гемоглобина минимален.

С целью выявления возможных типов химических взаимодействий ионогенных групп белка с функциональными группами антибиотиков применяли метод протолитометрического титрования [17]. В качестве модифицирующих агентов мы использовали коммерческие препараты антибиотиков, применяемые для лечения микоплазменной инфекции, в двух концентрациях — терапевтической и на порядок ниже: 1) класс макролиды: азитромицин (Сумамед, Хорватия) — $1{,}34 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1{,}34 \cdot 10^{-5}$ моль/л, рокситромицин (Roxithromycin 90 %, Sigma) — $7{,}2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $7{,}2 \cdot 10^{-6}$ моль/л, кларитромицин — $1{,}33 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1{,}33 \cdot 10^{-5}$ моль/л (Клацид, Abbott S.p.A), джозамицин — $1{,}21 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1{,}21 \cdot 10^{-5}$ моль/л (Josamycin, Sigma-Aldrich); 2) класс тетрациклины: доксициклин — $7{,}8 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $7{,}8 \cdot 10^{-6}$ моль/л (Doxycycline hyclate 98 % (TLC), Sigma-Aldrich); 3) класс линкозамиды: клиндамицин — $1{,}4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1{,}4 \cdot 10^{-5}$ моль/л (Clindamycin, Sigma); 4) класс фторхинолоны: ципрофлоксацин — $1{,}21 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1{,}21 \cdot 10^{-5}$ моль/л (Ciprofloxacin, ≥ 98.0 % (HPLC) Sigma-Aldrich), офлоксацин — $1{,}1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1{,}1 \cdot 10^{-5}$ моль/л (Ofloxacin, Sigma-Aldrich), спарфлоксацин — $1{,}02 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1{,}02 \cdot 10^{-5}$ моль/л (Sparfloxacin 98 % (HPLC) Sigma).

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с использованием стандартных пакетов Microsoft Excel. Рассчитывали средние значения вариант в группе из 4—5 доноров и стандартные отклонения. Полученные данные обрабатывали с использованием параметрических критериев ($p \leq 0{,}05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Величина τ интактных растворов гемоглобина (Hb) при 37 °С составила 24,75±0,21. Для растворов нативного белка было характерно возрастание интенсивности светорассеяния после инкубации при 55 °С, что свидетельствует об увеличении размеров его молекул в результате ослабления множества нековалентных связей, поддерживающих нативную конформацию гемопротеида. В опытах установлено дозозависимое повышение величины модифицированных антибактериальными препаратами водных растворов гемоглобина по сравнению с таковой растворов нативного белка (рис. 1):

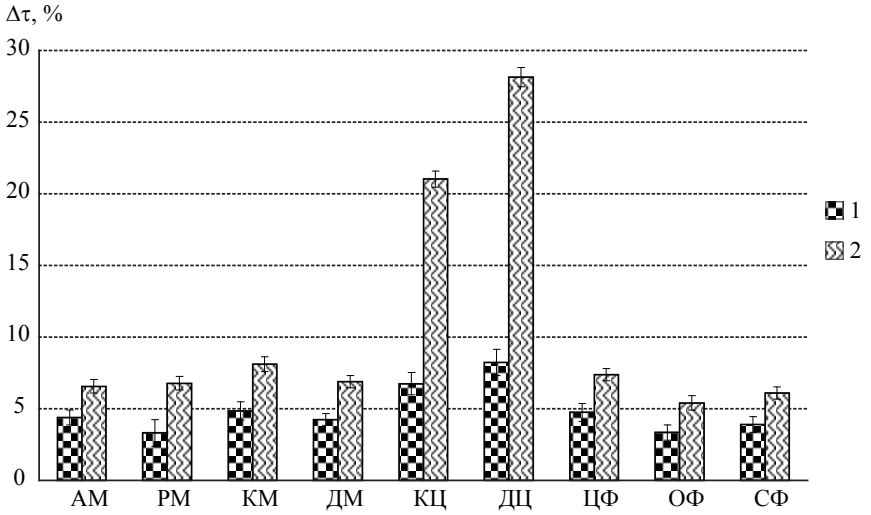

Рис. 1. Комбинированное влияние антибиотиков и температуры на интенсивность светорассеяния оксигемоглобина. Условные обозначения: *1* — концентрация АБП, на порядок ниже терапевтической; *2* — терапевтическая концентрация АБП. Здесь, и на рис. 2,3: АМ — азитромицин, РМ — рокситромицин, КМ — кларитромицин, ДМ — джозамицин, КЦ — клиндамицин, ДЦ — доксициклин, ЦФ — ципрофлоксацин, ОФ — офлоксацин, СФ — спарфлоксацин

Из анализа данных рис. 1 следует, что инкубирование растворов Hb, модифицированного АБП класса макролиды и фторхинолоны, приводит к повышению величины τ относительно контроля в среднем на 6,7±0,45 % в терапевтической концентрации и на 4,2±0,23 % при модификации гембелка меньшей концентрацией препарата. Согласно полученным данным, клиндамицин и доксициклин характеризуются высоким стерическим соответствием к пространственной структуре белка, повышая величину τ его растворов на 21±0,18 % и 28,1±0,35 % соответственно в терапевтической концентрации. Таким образом, молекулярные комплексы изученных антибиотиков с оксигемоглобином характеризуются меньшей термоустойчивостью по сравнению с немодифицированным (55 °С) гембелком.

Протолитометрическое титрование белковых растворов дает возможность получить сведения о характере изменения поверхности белковой глобулы при ее химической модификации [17]. Величина относительной буферной емкости белка $\Delta\beta$ (количество (мкл) КОН) определяет разницу между модифицированными антибиотиками образцами Hb и контролем (нативный раствор белка).

По изменению относительной буферной емкости $\Delta\beta$ в интервале pH 3—5; 5—9 и 9—11 нами установлены различные типы химических взаимодействий ионогенных групп белка с функциональными группами антибиотиков.

Анализ полученных данных проведенной серии опытов показал, что в области титрования карбоксильных групп (pH = 3—5) выявляется дозозависимое изменение относительной буферной емкости $\Delta\beta$ (по сравнению с контролем) при действии на молекулы белка всех антимикробных препаратов, кроме офлоксацина (рис. 2, 3):

Антибиотики класса макролиды и спарфлоксацин индуцировали снижение относительной буферной емкости водного раствора Hb относительно контроля. Максимальное уменьшение параметра $\Delta\beta$ (на 39 %) зарегистрировано для РМ, а минимальное — для СФ (4 %) в терапевтической концентрации. По всей вероятности, данный эффект обусловлен уменьшением числа карбоксильных групп, доступных для титрования, при образовании комплексов «антибиотик — COO– » белка. Увеличение параметра $\Delta\beta$ зарегистрировано для КЦ (на 3,5 %) в обеих концентрациях антибиотика. Это указывает на ограниченное число карбоксильных групп, доступных для титрования, при разворачивании белковой молекулы. При взаимодействии офлоксацина с белком не выявлено изменения буферной емкости. По всей вероятности, карбоксильные группы белка стерически недоступны функциональным группам антибиотика.

При анализе полученных данных об изменении относительной буферной емкости в области pH = 5—9 (имидазольная группа гистидина) было установлено:

а) приращение относительной буферной емкости при действии антибиотиков класса фторхинолоны (не более 20 %), клиндамицина (на 10 %) и доксициклина (на 25 %);

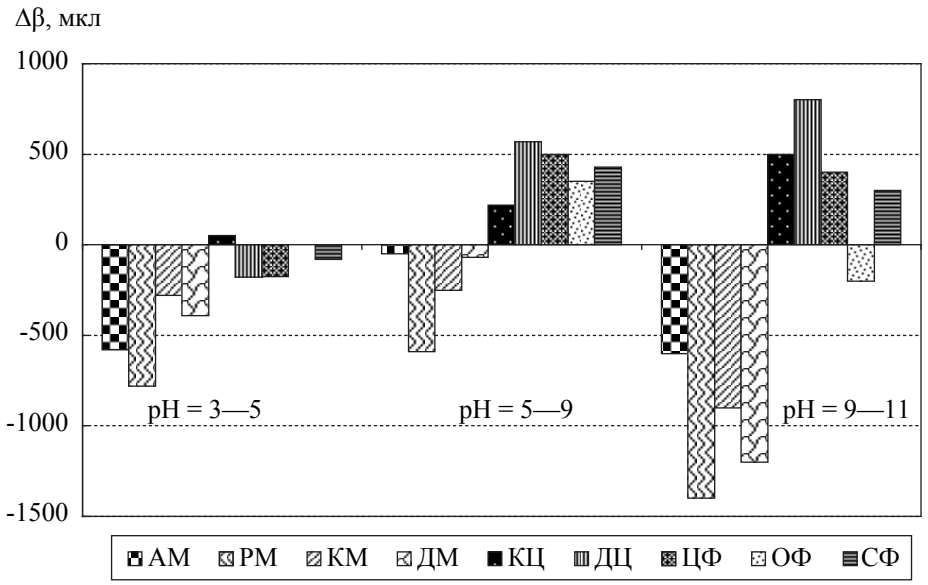

Рис. 2. Зависимость изменения относительной буферной емкости водных растворов гемоглобина ($\Delta\beta$), модифицированных антибиотиками в терапевтической концентрации, от величины pH

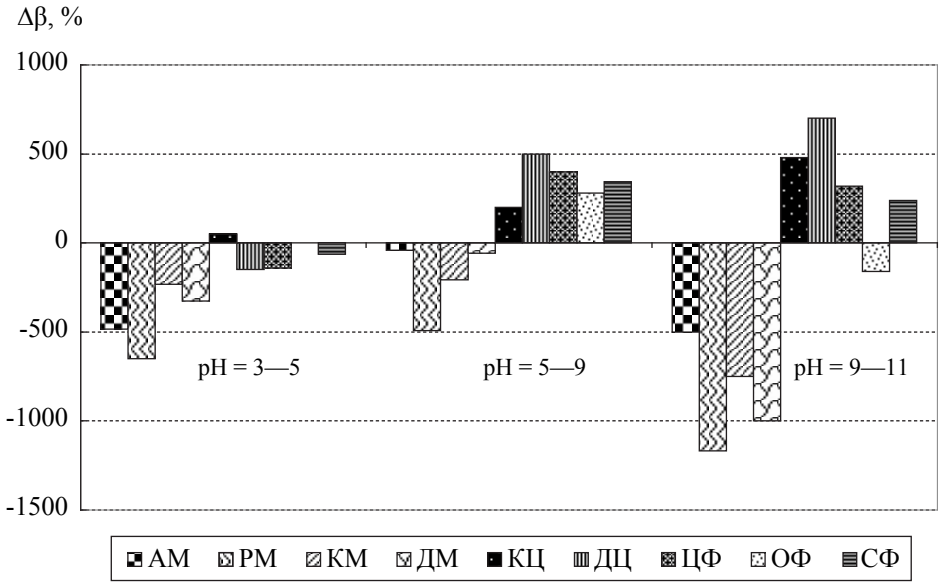

Рис. 3. Зависимость изменения относительной буферной емкости водных растворов гемоглобина ($\Delta\beta$), модифицированных антибиотиками в концентрации, на порядок ниже терапевтической, от величины pH

б) снижение относительной буферной емкости молекул гемоглобина, по сравнению с контролем, при взаимодействии белка с макролидами, при этом максимальное уменьшение $\Delta\beta$ индуцировал рокситромицин в терапевтической концентрации (на 26 %).

Результаты проведенных исследований в данной области pH позволяют констатировать однонаправленность действия на белковую молекулу изучаемых фторхинолонов, клиндамицина и доксициклина и блокирование преимущественно гистидина антибиотиками класса макролиды.

В области pH = 9—11, где титруются остатки ионогенных групп лизина и тирозина, установлено снижение относительной буферной емкости водного раствора Hb по отношению к контролю при действии антибиотиков класса макролиды (в среднем на 8 %) и офлоксацина (на 3 %) в терапевтической концентрации. Приращение относительной буферной емкости Hb индуцировали ЦФ (увеличение $\Delta\beta$ на 3 %), СФ (на 2,2 %), КЦ (на 3,6 %) и ДЦ (на 6 %), что указывает на разворачивание белковой молекулы и увеличение количества ионогенных групп, доступных для титрования. Незначительное изменение относительной буферной емкости в указанной области pH позволяет сделать предположение о том, что данные антибиотики в обеих концентрациях не проявляют высокой химической активности, реализуемой образованием прочных комплексов с белковой молекулой.

Из анализа полученных данных следует, что степень активности АБП в отношении ионогенных групп белка определяется их химической природой. Фторхинолоны являются амфолитами, так как содержат в молекуле одновременно основные центры — вторичный (ЦФ, СФ) или третичный (ОФ) алифатические атомы азота и кислотный центр — карбоксильную группу [18]. Согласно данным титрования, они представляют собой слабые одноосновные кислоты, значения pK которых 7,3—8,8. Ввиду особенностей строения бензоксазинового цикла в офлоксацине и чисто хинолонового фрагмента в ЦФ и СФ, их структуры существенно различаются, что и проявляется в неодинаковом сродстве указанных препаратов к ионогенным группам гемоглобина. В зависимости от pH среды, данные антибиотики могут существовать в четырех формах: нейтральной, анионной, катионной, цвиттер-ионной, чему способствует относительная подвижность электронов и протонов при сложных окислительно-восстановительных процессах [18]. Наличие разнообразных функциональных группировок и небольшой размер молекул является основой высокой активности изучаемых средств и имеет большое значение для их проникновения через биологические мембраны в организме.

Антибиотики класса макролиды — крупные молекулы, содержат лактонное кольцо с метильными и гидроксильными заместителями в различных положениях и один-два сахарных остатка. Наличие диметиламинной группы [$-N(CH_3)_2$], способной к

присоединению протона, определяет величину pK_a макролидов, примерно равную 9 [20]. Аминная группа способна присоединять протон при определенных значениях pH. У азитромицина 2 аминогруппы, имеющих свои величины pK_a (8.85; 8.74—9.45). По своей природе макролиды являются слабыми основаниями. Их активность возрастает в щелочной среде, при которой они меньше ионизируются и лучше проникают внутрь клетки [21]. Макролиды способны длительно сохранять свою концентрацию в крови на практически неизменном уровне, не образуя прочных комплексов с белковыми молекулами [1, 4, 7]. В наших исследованиях снижение относительной буферной емкости Hb в широком диапазоне pH (3—11), вызванное данными антибиотиками, указывает на их комплексирование с различными ионогенными группами белка.

Клиндамицин, фармакологически и биологически близкий макролидам, относят к слабым основаниям (рис. 4):

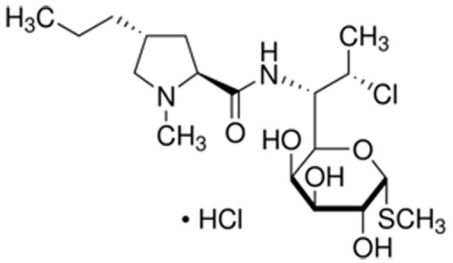

Рис. 4. Структурная формула клиндамицина

Известно, что CH_3-группы характеризуются положительным индукционным эффектом, смещая электронную плотность к связывающим их атомам. Высокая полярность HO-групп и поляризация амидной связи (–NH–CO) позволяют предположить наличие в молекуле клиндамицина связанной воды, образующей гидратную оболочку антибиотика. В этом случае при взаимодействии с гидрофобными или гидрофильными участками молекулы белка возможно нарушение слабых водородных связей и (или) ослабления электростатических взаимодействий, стабилизирующих пространственную структуру гемоглобина. В наших исследованиях было установлено снижение термостабильности водных растворов Hb, модифицированных клиндамицином, и приращение параметра $\Delta\beta$ во всех областях pH. Минимальное изменение $\Delta\beta$ в кислой области pH обусловлено, по нашему мнению, блокированием некоторого количества карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот Hb в результате протекания реакций этерификации с HO-группами антибиотика: Белок — COOH + OH — АБ → Белок — O — C (O) — АБ.

В основе химической структуры доксициклина лежит конденсированная четырехциклическая система и наличие метильных и гидроксильных групп (рис. 5):

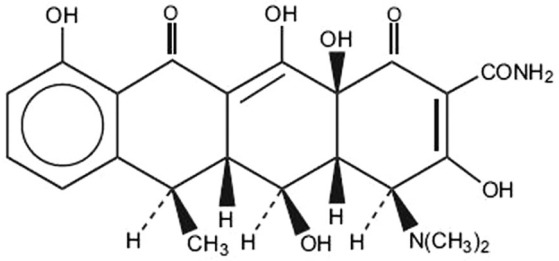

Рис. 5. Структурная формула доксициклина

Подобно клиндамицину, доксициклин индуцировал максимальное повышение параметра $\Delta\tau$ водных растворов Hb, обусловленное, по-видимому, низким уровнем стерических ограничений и доступностью скрытых участков гемоглобина молекулам антибиотика. В отношении ионогенных групп белка данные антибиотики проявляли слабое химическое сродство к аминогруппам гистидина и лизина.

Принимая во внимание результаты полученных данных, следует отметить, что ДЦ и КЦ взаимодействуют преимущественно с карбоксильными группами белка; антибиотики класса макролиды — с карбоксильными группами остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот и, в меньшей степени, с аминогруппами лизина и тирозина; фторхинолоны ЦФ и СФ с карбоксильными группами; ОФ проявляет наибольшую активность по отношению к аминогруппам лизина и тирозина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании анализа результатов проведенных исследований можно сделать вывод о том, что изученные нами антибиотики обладают определенным сродством к молекуле гемоглобина. Проникая в эритроцитарные клетки, они изменяют структурную жесткость последнего, а, следовательно, и его способность влиять на проницаемость мембран эритроцитов для веществ и их диффузию в цитоплазме. На клеточном уровне такие процессы взаимодействия лекарственных препаратов с биологическими объектами способствуют изменению эластичности мембранных структур, проницаемости для различных веществ, а также, по-видимому, изменению активности ряда ферментов и биоэлектрогенеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антибактериальная терапия: Практическое руководство / JI. С. Страчунский, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлов. — М., 2000. — 190 с.

2. *Белозеров Е. С.* Медикаментозные осложнения: 1-е изд. / Е. С. Белозеров, Е. И. Змушко. — СПб: Изд-во Питер, 2001. — 448 с.

3. *Егоров Н. С.* Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. / Н. С. Егоров. — М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. — 528 с.

4. Ланчини Д. Антибиотики / Д. Ланчини, Ф. Паренти. — М. : Изд-во Мир, 1985. — 272 с.

5. *Лопатин А. С.* Побочное действие лекарств / А. С. Лопатин, И. М. Станковская. — М. : 1989. — 62 с.

6. *Селизарова Н. О.* Антибиотики, нарушающие синтез макромолекул / Н. О. Селизарова // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. — 2003. — Т. 1. — № 1. — С. 71—79.

7. *Страчунский Л. С.* Макролиды в современной клинической практике / Л. С. Страчунский, С. Н. Козлов. — Смоленск : Изд-во Русич, 2007. — 200 с.

8. *Семенов Д. М.* Опыт применения антибактериальных препаратов группы фторхинолонов (ципрофлоксацина) в комплексных схемах лечения женщин с неспецифическими воспалительными заболеваниями органов малого таза / Д. М. Семенов, А. А. Воронецкая // Охрана материнства и детства. — 2007. — Т.1—9. — С. 101—104.

9. *Сидоренко С. В.* Механизмы резистентности микроорганизмов: практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / С. В. Сидоренко; под ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова. — Смоленск, МАКМАХ, 2007. — 464 с.

10. *Сидоренко С. В.* Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С. В. Сидоренко, В. И. Тишков // Успехи биологической химии. — 2004. — Т. 44. — С. 263—306.

11. Gramicidin S effect on human blood platelets depends on the mobility of membrane lipids / E. Hackl [et al.] // Journal of Peptide Science. — 2006. — Volume 12, Issue S1. — P. 227.

12. *Lorian V. Ed.* Antibiotics in laboratory medicine. 5-th edition. Williams & Willrins / V. Lorian. — Baltimore, 2005. — 832 p.

13. *Логинова Н. В.* Введение в фармацевтическую химию : учеб. пособие / Н. В. Логинова, Г. И. Полозов. — Минск : «Электронная книга БГУ», 2003. — 250 с.

14. *Брагина Н. А.* Мембранология : учеб. пособие / Н. А. Брагина, А. Ф. Миронов. — М. : ИПЦ МИТХТ, 2002. — 98 с.

15. *Желдакова Р. А.* Механизмы биосинтеза антибиотиков и их действие на клетки микроорганизмов: Учеб.-метод. комплекс / Р. А. Желдакова. — Мн.: БГУ, 2004. — 111 с.

16. *Калашникова И. В.* Механизмы взаимодействия антибиотиков пенициллинового ряда с эритроцитами человека / И. В. Калашникова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2008. — Т. 146, № 10. — С. 419—423.

17. Практикум по биофизике / В. Г. Артюхов [и др.]. — Воронеж : Изд-во Воронеж. ун-та, 2001. — 224 с.

18. *Артюхов В.Г.* Биофизика / В. Г. Артюхов, В. П. Шмелев, Т. А. Ковалева. — Воронеж: Изд-во ВГУ, 1994. — 327 с.

19. *Титов И. В.* Использование метода УФ-спектроскопии для установления подлинности лекарственных средств группы фторхинолонов / И. В. Титов, В. Л. Дорофеев, А. П. Арзамасцев // Вестник Воронеж. гос. ун-та. Сер. Химия. Биология. Фармация. — 2004. — №2. — С. 264—269.

20. Spectrophotometric determination of acidity constants of some macrolides in acetonotrile-water binary mixtures / Senem Sanli [et al.] // Acta Chim. Slov. — 2010. — Vol. 57. — P. 980—987.

21. Clinical pharmacokinetic properties of the macrolide antibiotics. Effects of age and various pathphysiological states (part I) / P. Periti [et al.] // Clin. Pharmacokinet. — 1989. — Vol. 16. — P. 193—214.

Баева Елена Сергеевна — аспирант, Воронежский государственный университет; e-mail: galaxy1985@mail.ru

Резван Сергей Григорьевич — к.б,н., доцент, Воронежский государственный университет; e-mail: starn2008@mail.ru

Артюхов Валерий Григорьевич — д.б.н., профессор, Воронежский государственный университет; тел.: (473) 220-8981

Baeva Elena S. — Voronezh State University, postgraduate student; e-mail: galaxy1985@mail.ru, tel: (916) 137-3602

Rezvan Sergey G. — PhD, Voronezh State University, associate professor, e-mail: starn2008@mail.ru

Artyukhov Valery G. — professor, PhD, Voronezh State University, tel.: (473) 220-8981