

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ
В ОЦЕНКЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ
ОКСИГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ
МЕКСИДОЛА, ДЕКСАМЕТАЗОНА И ДОКСИЦИКЛИНА
*IN VITRO*****Е.С. Баева¹, В.Г. Артюхов²**¹ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»,

Поступила в редакцию 12.07.2023 г.

Аннотация. Фармакокинетика, биораспределение и биологическая активность веществ являются ключевыми параметрами, определяющими успех или неудачу проводимой терапии. Многие разработки, направленные на улучшение эффективности препаратов *in vivo*, нацелены на модулирование их концентрации, либо биораспределения в тканях, клетках или субклеточных структурах. Системы доставки на основе эритроцитов особенно эффективны для поддержания активных доз лекарственных средств в циркулирующей крови, их высвобождения в течение нескольких дней или недель. Выявление особенностей и нюансов биосовместимости представителей различных классов соединений является актуальной задачей. Целью настоящей работы было исследование сочетанного влияния мексидола, доксициклина гидрохлорида и дексаметазона на состояние оксигемоглобина человека. Методом УФ-спектрофотометрии показано, что исследуемые соединения характеризуются уникальными полосами поглощения, характерными для их функционально активных групп: доксициклин – 272 и 345 нм, мексидол – 200 и 295 нм, дексаметазон – 242 нм. Сочетанное нахождение мексидола и доксициклина, а также дексаметазона и доксициклина в инкубационной среде приводит к частичному экранированию фенольных групп доксициклина. Мексидол и дексаметазон в терапевтической концентрации не вызывают достоверных отличий в молекулах оксигемоглобина относительно контроля – нативного гембелка. Доксициклин в отдельности, а также в комбинации с мексидолом способствует перераспределению электронной плотности в молекулах оксигемоглобина, преимущественно затрагивая ее гемовую составляющую. Предположительно комплексообразование антибиотика с гемоглобином происходит на уровне гемового кармана, что вызывает волну конформационных превращений и ограничивает тем самым доступ эндогенным окислителям, предотвращая метгемоглобинообразование. Величина максимумов и их положение в длинноволновых областях электронных спектров поглощения водных растворов оксигемоглобина не претерпело статистически достоверных изменений, в отличие от гиперхромного эффекта, зарегистрированного при 274 и 345 нм, что свидетельствует об изменении оптической плотности среды. Ввиду обнаруженных эффектов взаимодействия исследуемых лекарственных препаратов с оксигемоглобином человека рекомендуется соблюдение временного интервала между их введениями в организм человека для поддержания эффективной кислородтранспортной функции.

Ключевые слова: УФ-спектрофотометрия, оксигемоглобин, мексидол, дексаметазон, доксициклина гидрохлорид, электронный спектр поглощения

Комбинированное применение различных фармакологических препаратов в терапии воспалительных, инфекционных, нейродегенеративных и иных состояний человека не новь для современной медицины. Успешное использование

эритроцитарных клеток в качестве носителей лекарственных средств показано во многих работах, что доказывает безопасность и эффективность лечения, способствует разработке терапии сложных патологий (особенно хронического типа и наличия побочных эффектов) и новых диагностических подходов [1]. Изучение морфофункци-

ональных свойств эритроцитов и внутриклеточного гемоглобина в присутствии терапевтических агентов перспективно в контексте оценки эффективности проводимой терапии.

Одним из активно применяемых в клинической практике лекарственных средств является дексаметазон – гормон стероидной природы, обладающий иммунодепрессивным, противовоспалительным, противоаллергическим и иными свойствами. Механизмы его действия связывают с подавлением активности фосфолипазы А2 и каскада арахидоновой кислоты, содействием экспрессии и повышению чувствительности адренорецепторов, торможением синтеза иммуноглобулинов. Было показано [2-4], что аутологичные эритроциты могут быть использованы в качестве носителей дексаметазона – его очень низкая доза, длительно высвобождаемая в кровотоке (около месяца), позволяла поддерживать у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника клиническую ремиссию и отказаться от стероидов (рис. 1, а).

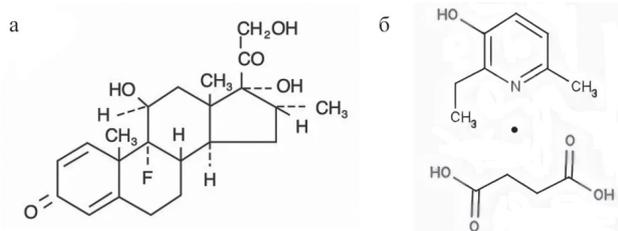


Рис. 1. Структурные формулы дексаметазона (а) и мексидола (б)

Применение мексидола – 2-этил-6-метил-3-гидрокси-пиридина сукцината (рис. 1, б) – способствует инактивации свободных радикалов и повышению активности антиоксидантных ферментов глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы, уровня экспрессии при ишемии фактора транскрипции Nrf2, ответственного за устойчивость клеток к окислительному стрессу. Янтарная кислота в молекуле мексидола поддерживает работу сукцинатоксидазы цикла Кребса в условиях дефицита кислорода, связывается с ее специфическими рецепторами (GPR91) и запускает каскад биохимических реакций, повышающих эффективность препарата [5-7]. Показано, что мексидол предотвращает изменения морфометрических параметров эритроцитов и кислородтранспортную функцию гемоглобина у крыс с карциномой Walker-256 в эксперименте, однако, способствует увеличению плотности упаковки гемоглобина в эритроцитах [8]. Подтверждено влияние мексидола на текучесть крови при острой ишемии го-

ловного мозга, снижении вязкости крови, уровня гематокрита и фибриногена, повышении деформируемости эритроцитов, снижении уровня метгемоглобина [9-12].

Существует большое количество современных антибактериальных препаратов, применяемых при воспалительных и нейродегенеративных процессах у человека. Среди прочих, особую значимость имеют тетрациклиновые антибиотики, используемые, в том числе, и при развитии онкологических состояний [13-16]. Доксциклин – представитель семейства тетрациклиновых антибиотиков – известен наличием неантибактериальных эффектов, среди которых особую значимость имеют иммуномодулирующая, противовоспалительная и противоопухолевая активности (рис. 2).

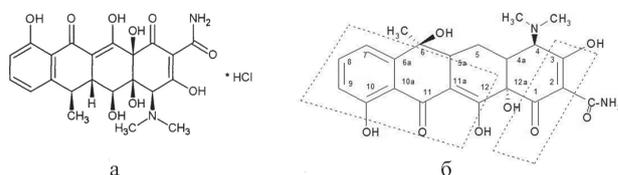


Рис. 2. Структурная формула доксициклина (а) и положение заместителей в молекуле тетрациклинов (б)

Показано, что использование ДЦ может способствовать изменению соотношения трансформационных форм эритроцитов, приводить к повышению гетерогенности эритроцитарных популяций [17,18]. Сочетанное использование и монотерапия вышеупомянутыми лекарственными препаратами показано при ряде состояний воспалительной, онкологической, нейродегенеративной и иной этиологии [19-28]. Цель данной работы – исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе поддержания функциональной целостности кислородтранспортной функции гемоглобина человека, выделенного из эритроцитов крови доноров после их предварительной инкубации с растворами дексаметазона, мексидола и доксициклина.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Гемоглобин донорской крови выделяли по стандартной методике из эритроцитов после их часовой инкубации с доксициклином (ДЦ) гидрохлоридом ($8,3 \times 10^{-5}$ моль/л (Sigma-Aldrich)), навеску которого растворяли в заданном объеме изотонического раствора хлорида натрия, препаратами Мексидол (Фармасофт, $4,47 \times 10^{-6}$ мкг/мл) и дексаметазон (Эллара, 2×10^{-6} моль/л). Методом УФ-спектрофотометрии

проводили регистрацию электронных спектров поглощения (ЭСП) исследуемых соединений и водных растворов оксигемоглобина на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 PC в диапазоне длин волн от 190 до 900 нм. Оптическую плотность (D) растворов регистрировали на протяжении всего исследуемого диапазона через 1 нм (кварцевые кюветы толщиной 10 мм). Статистическую обработку данных осуществляли с помощью прикладных пакетов Microsoft Excel ($p \leq 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно данным литературы [29, 30], наличие в молекуле тетрациклиновых антибиотиков двух цепей сопряжения обуславливает их интенсивную желтую окраску и полосы поглощения в УФ области спектра. Молекулы тетрациклинов хиральны, обладают оптической активностью, амфотерными свойствами; они содержат: фенольный гидроксил (положение 10); енольный гидроксил (положения 3 и 12); диметиламиногруппу (положение 4); карбоксамидную группу (положение 2); метильную группу (положение 6); спиртовые гидроксилы (положения 6 и 12а); кетогруппы (1 и 11). Кислотные свойства данных веществ обусловлены тремя гидроксильными группами. Наиболее сильной кислотой является енольный гидроксил (1), связанный с 3-м атомом углерода. Гидроксильные группы, связанные с 10-м и 12-м атомами углерода, входят в состав сопряжённой системы (рис. 2, б). Основные свойства обусловлены диметиламиногруппой. В водных растворах катионы тетрациклиновых антибиотиков вступают в протолитическое взаимодействие с водой, приводящее к образованию малорастворимых оснований [29, 30]. Проведенный нами анализ спектральных характеристик водных растворов ДЦ гидрохлорида позволил выявить наличие двух максимумов поглощения – при 272 и 345 нм. Максимум при 272 нм обусловлен π -электронами в составе фенольных групп; максимум при 345 – амидной группой, входящей в состав солей доксицилина.

Дексаметазон характеризовался наличием максимума в УФ-области при $\lambda=242$ нм, что характерно для цисоидных циклических диенов. По-видимому, он обусловлен π - π^* переходом электронов кольца агонановой структуры, что возможно благодаря наличию системы сопряженных π -связей, состоящей из кетогруппы в положении 3 кольца А и одной или двух двойных связей в этом же кольце. Мексидол – комплексное соединение – характеризовался двумя максимумами поглощения при 200 (α ,

β -непредельная карбоновая кислота или ее производные в молекуле мексидола) и 295 нм (полиен с 3-6 сопряженными двойными связями) (рис. 3).

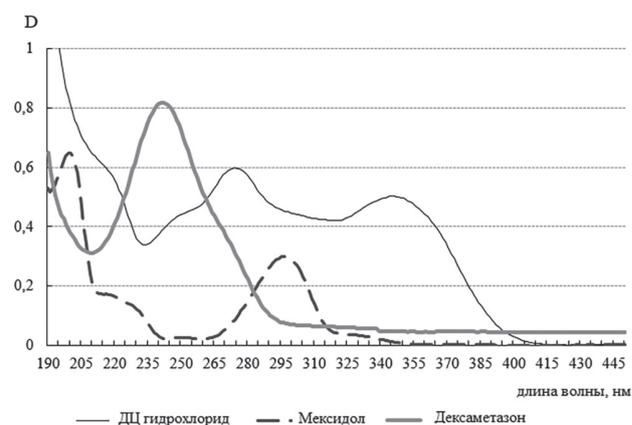


Рис. 3. ЭСП водных растворов ДЦ гидрохлорида, мексидола и дексаметазона

Сочетанное использование ДЦ гидрохлорида с мексидолом и дексаметазоном вызывает изменение спектральных характеристик образцов (рис. 4). Традиционно о наличии взаимодействия между веществами судят либо по появлению новой полосы поглощения (обычно промежуточной между полосами поглощения тестируемых веществ), либо путем отсутствия в спектре поглощения тестируемого вещества какого-то максимума. Из зарегистрированных нами спектров следует, что дексаметазон взаимодействует с хромофором ДЦ, отвечающим за светопоглощение при длинах волн 250-280 нм. ДЦ не взаимодействует с длинноволновым (352 нм) хромофором дексаметазона, а только с его коротковолновым хромофором. Из спектра следует батохромный (длинноволновый) сдвиг примерно на 6 нм, свидетельствующей о том, что имеет место взаимодействие между той функциональной группой ДЦ, которая дает светопоглощение в коротковолновой области (примерно 250 нм). Взаимодействие между веществами подтверждается и тем фактом, что крыло (неявно выраженная полоса) в спектре ДЦ нивелируется светопоглощением за счет дексаметазона. Можно предположить, что дексаметазон экранирует некие функциональные группы в составе ДЦ и становится в этой области доминирующим. То, что длинноволновая часть спектра не изменяется (352 нм) говорит о том, что не только нет прямого взаимодействия, но и нет влияния индукции, т.е. влияния через электрическое поле или зарядового состояния системы. Соответственно, процессы сконцентрированы в области хромофоров до 280 нм (рис. 4).

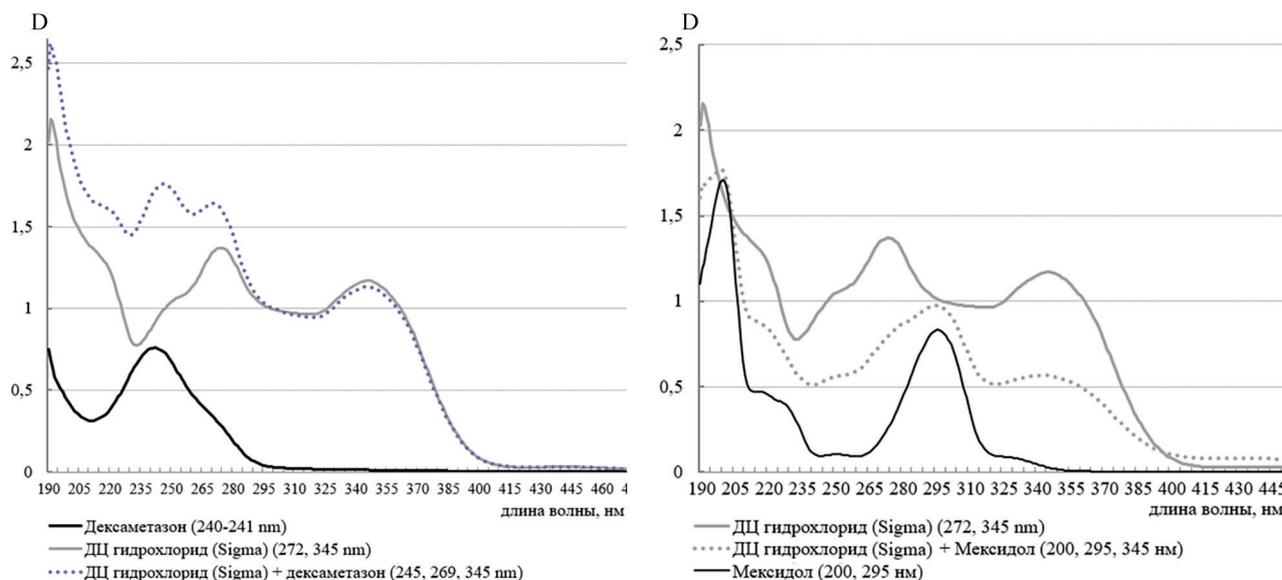


Рис. 4. ЭСП водных растворов ДЦ, мексидола и дексаметазона при комбинированном использовании

Как следует из представленных данных, ЭСП раствора «мексидол+ДЦ» сохраняет полосу поглощения при 345 нм, характерной для ДЦ, и 200 и 295 нм, принадлежащих мексидолу. В результате совместного нахождения веществ в растворе нивелируется полоса 272 нм, присущая фенольным группам ДЦ. Общеизвестно, что для фенолов характерны реакции электрофильного замещения по ароматическому кольцу [29, 30]; по всей вероятности, данные группы антибиотика экранируются в смеси веществ, формируя донорно-акцепторные отношения. Взаимодействие между исследуемыми соединениями выявляется и при слиянии растворов мексидола с дексаметазоном, а также с раствором ДЦ (рис. 5).

Таким образом, при слиянии дексаметазона и мексидола, как и всех трех исследуемых соединений между собой, происходит исчезновение полосы дексаметазона при 242 нм, характерной для цисоидных циклических диеновых группировок. Мы полагаем, что между данными веществами происходят реакции конъюгирования, затрагивающие их функционально активные группы: ДЦ – фенольные и амидные группы, дексаметазон – диеновые группы, мексидол – непредельные кислотные группы и полиены с сопряженными двойными связями. По-видимому, конъюгирование может происходить между группами CO= в дексаметазоне и группами -COOH в мексидоле.

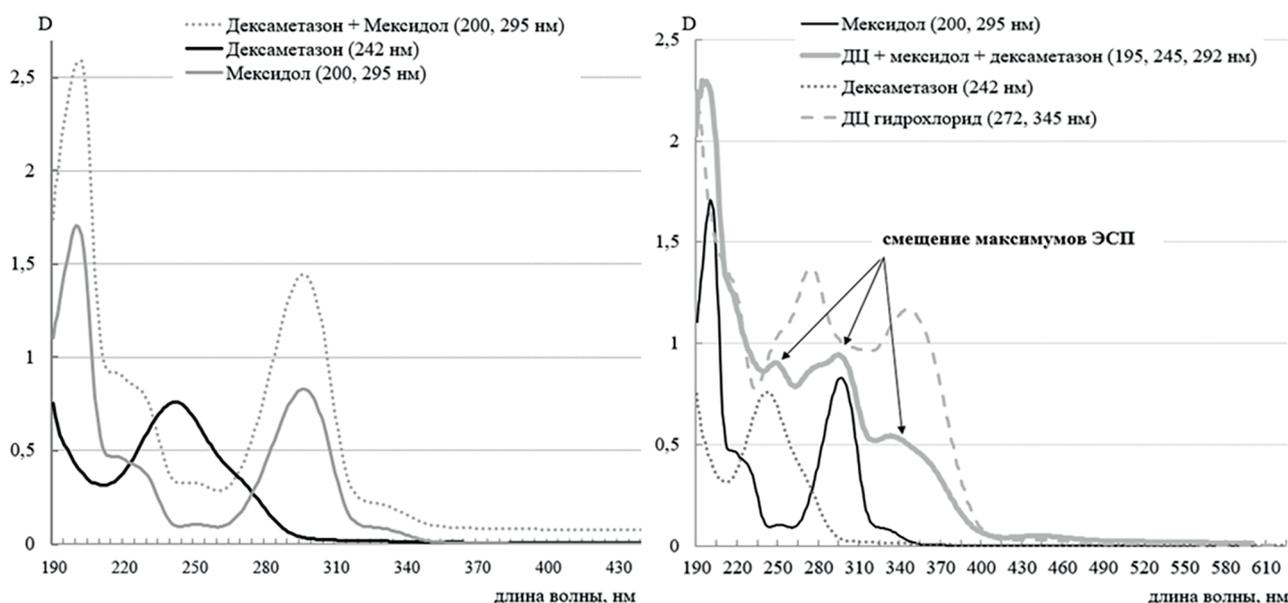


Рис. 5. Изменение в ЭСП водных растворов исследуемых веществ

В наших предыдущих работах было показано изменение соотношения лигандных форм гемоглобина в сторону дезоксигемоглобина в исследованиях с предварительной инкубацией эритроцитов крови доноров с доксициклином и мексидолом [17, 18]. Выявленное торможение процессов метгемоглибинообразования в растворах, содержащих мексидол, полностью согласуется с данными литературы, включающими доказательную базу эффекта компактизации молекул гемоглобина в единичных эритроцитах [8]. Поэтому в следующей серии опытов нами исследовано влияние спектральных характеристик оксигемоглобина, выделенного из эритроцитов после их предварительной инкубации с модификаторами (рис. 6).

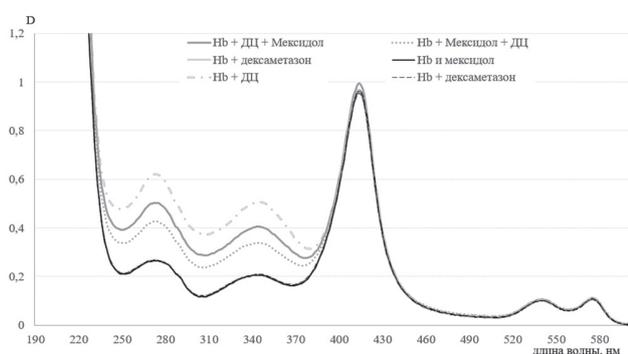


Рис. 6. ЭСП водных растворов оксигемоглобина, выделенного из эритроцитов крови доноров после их часовой инкубации с мексидолом, дексаметазоном и доксициклином гидрохлоридом

Полученные данные свидетельствуют о том, что присутствие ДЦ способствует перераспределению электронной плотности в белковой области спектра, что может быть объяснено комплексированием модификатора с молекулами гембелка. Последовательное введение в раствор мексидола и ДЦ, либо ДЦ и мексидола вызывает изменения спектральных свойств, проявляющиеся при длинах волн $\lambda = 272$ нм и 342 нм. Следовательно, белковая часть гемоглобина может изменять свои структурно-функциональные особенности и влиять на расположение гемового кармана. Отличия в ЭСП оксигемоглобина в присутствии мексидола и дексаметазона статистически не достоверны; графически спектры поглощения этих соединений почти сливаются и трудно различимы (рис. 6). Таким образом, индуцированное модификаторами изменение спектральных свойств оксигемоглобина, по-видимому, является отражением волны конформационных изменений на уровне гема и глобина, что сопровождается частичным отрывом лиганда (O_2) от молекулы белка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволяют заключить, что мексидол и дексаметазон в терапевтической концентрации не вызывают достоверных изменений в молекулах оксигемоглобина относительно контроля – интактного гембелка. В то же время мексидол, дексаметазон и доксициклина гидрохлорид являются достаточно активными химическими соединениями, способными к реакциям комплексообразования/конъюгирования как между собой, так и с молекулами оксигемоглобина человека при сочетанном взаимодействии. Молекулы доксициклина экранируют гемовый карман оксигемоглобина, снижая доступность порфиринового кольца к действию эндогенных окислителей, что подтверждает тезис о снижении/блокировании метгемоглибинообразования в растворах гембелка. Действие всех исследуемых соединений в основном ограничивается областью железопорфирина, однако, волны конформационных превращений затрагивают и белковую часть молекул гемопротеида. Значение максимумов в длинноволновых областях ЭСП гемоглобина статистически достоверно не изменялось. Ввиду обнаруженных эффектов взаимодействия лекарственных препаратов с оксигемоглобином человека рекомендуется соблюдение временного интервала между их введениями в организм человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rossi L. Engineering erythrocytes for the modulation of drugs' and contrasting agents' pharmacokinetics and biodistribution / L. Rossi, F. Pierigè, A. Antonelli, N. Bigini, C. Gabucci, E. Peiretti, M. Magnani // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2016. – Vol. 106(Pt A). – P. 73-87.
- Annese V. Erythrocytes-mediated delivery of dexamethasone in steroid-dependent IBD patients-a pilot uncontrolled study / V. Annese, A. Latiano, L. Rossi, G. Lombardi, B. Dallapiccola, S. Serafini, G. Damonte, A. Andriulli, M. Magnani // *American Journal of Gastroenterology*. – 2005. – Vol. 100. – № 6. – P. 1370-1375.
- Mambrini G. Red Blood Cell Membrane Processing for Biomedical Applications / G. Mambrini, M. Mandolini, L. Rossi, F. Pierigè, G. Capogrossi, P. Salvati, S. Serafini, L. Benatti, M. Magnani // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2017. – Vol. 517. – № 1-2. – P. 175-184.
- Coker S. A. A Study of the Pharmacokinetic Properties and the In Vivo Kinetics of Erythrocytes Loaded With Dexamethasone Sodium Phosphate

- in Healthy Volunteers / S. A. Coker, Z. M. Szczepiorkowski, A. H. Siegel, A. Ferrari, G. Mambri, R. Anand, R. D. Hartman, L. Benatti, L. J. Dumont // *Transfusion Medicine Reviews*. – 2018. – Vol. 32. – № 2. – P. 102-110.
5. Voronina T. A. Effects of mexidol in patients with chronic brain ischemia and chronic heart failure (II-III functional class) / T. A. Voronina, E. A. Ivanova // *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. – 2019. – Vol. 119. – № 4. – P.115-124.
6. Shamrey V. K. The possibilities of using Mexidol in the complex therapy of psychological disorders / V. K. Shamrey, E. S. Kurasov, V. V. Nechiporenko, A. I. Kolchev, N. V. Tsygan // *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. – 2020. – Vol. 120. – № 5. – P. 160-164.
7. Shchulkin A. V. A modern concept of antihypoxic and antioxidant effects of mexidol / A. V. Shchulkin // *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. – 2018. – Vol. 118. – № 12-2. – P. 87-93.
8. Siprov A. V. Morphofunctional State of Erythrocytes in Rats with Walker-256 Carcinoma Treated with Docetaxel and Xymedon / A. V. Siprov, M. A. Solovyova // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2017. – Vol. 164. – № 1. – P. 44-48.
9. Plotnikov D. M. Evaluation of blood rheology by patients with acute ischemic stroke with Mexidol administration / D. M. Plotnikov, M. N. Stegmeier, O. I. Aliev // *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. – 2019. – Vol. 119. – № 3(2). – P. 76-82.
10. Makletsova M. G. The effect of antioxidants on in vivo and in vitro methemoglobin formation in erythrocytes of patients with Parkinson`s disease / M. G. Makletsova, G. T. Rikhireva, V. V. Poleshuk, K. V. Grjakalov, S. L. Timerbaeva, T. N. Fedorova // *Biomeditsinskaya Khimiya*. – 2016. – Vol. 62. – № 2. – P. 193-197.
11. Громова О. А. Опыт применения мексидола в неврологической практике / О. А. Громова, И. Ю. Торшин, Л. В. Стаховская, Е. Н. Пепеляев, В. А. Семенов, А. Г. Назаренко // *Журнал неврологии и психиатрии*. – 2018. – № 10. – С. 94 – 104.
12. Shchukin I. A. Neuroprotective therapy with citicoline (Ceraxon) in patients with ischemic stroke / I. A. Shchukin, M. S. Fidler, I. A. Koltsov, A. Y. Suvorov // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2022. – № 52(5). – P. 649-656.
13. Hadjimichael A. C. The antineoplastic effect of doxycycline in osteosarcoma as a metalloproteinase (MMP) inhibitor: a systematic review / A. C. Hadjimichael, A. F. Foukas, O. D. Savvidou, A. F. Mavrogenis, A. K. Psyrris, P. J. Papagelopoulos // *Clinical Sarcoma Research*. – 2020. – № 30. – P. 10:7.
14. Alexander-Savino C. V. Doxycycline is an NF- κ B inhibitor that induces apoptotic cell death in malignant T-cells / C. V. Alexander-Savino, M. S. Hayden, C. Richardson, J. Zhao, B. Poligone // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – № 46. – P. 75954 – 75967.
15. Markowska A. Doxycycline, salinomycin, monensin and ivermectin repositioned as cancer drugs / A. Markowska, J. Kaysiewicz, J. Markowska, A. Huczyński // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2019. – Vol. 29. – № 13. – P. 1549-1554.
16. Lamb R. Doxycycline down-regulates DNA-PK and radiosensitizes tumor initiating cells: Implications for more effective radiation therapy / R. Lamb, M. Fiorillo, A. Chadwick, B. Ozsvári, K. J. Reeves, D. L. Smith, R. B. Clarke, S. J. Howell, A. R. Cappello, U. E. Martinez-Outschoorn, M. Peiris-Pagès, F. Sotgia, M. P. Lisanti // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 10. – №6(16). – P.14005-14025.
17. Бабаскина А. И. Анализ воздействия некоторых солей доксициклина на структурное состояние эритроцитов и гемоглобина человека / А. И. Бабаскина, Е. С. Баева, В. Г. Артюхов // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. – 2021. – № 2. – С. 62-68.
18. Баева Е. С. Наука. Исследования. Практика : сборник избранных статей по материалам Международной научной конференции, Санкт-Петербург, 25 декабря 2020 года / Е. С. Баева, О. И. Тюнина, А. И. Бабаскина – Санкт-Петербург: «НАЦРАЗВИТИЕ», 2020. – С. 13-15.
19. Волчегорский И. А. Влияние производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты на физическую работоспособность мышей и их устойчивость к острой гипоксии различного генеза / И. А. Волчегорский, И. Ю. Мирошниченко, Л. М. Рассохина // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. – 2016. – Т. 102. – № 11. – С. 1312-1322.
20. Волчегорский И. А. Влияние производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты на устойчивость к острой церебральной ишемии (экспериментальное исследование) / И. А. Волчегорский, И. Ю. Мирошниченко, Л. М. Рассохина, Файзуллин Р.М., Пряхина К.Е., Малкин М.П., Калугина А.В // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2015. – Т. 115. – № 2. – С. 48-52.
21. Noreen S. Dexamethasone: Therapeutic potential, risks, and future projection during COVID-19 pandemic / S. Noreen, I. Maqbool, A. Madni // *European journal of pharmacology*. – 2021. – Vol. 894. – P. 173854.

22. Namazi N. The effectiveness of dexamethasone as a combination therapy for COVID-19 / N. Namazi // *Acta Pharmaceutica*. – 2022. – Vol. 72. – № 3. – P. 345-358.
23. Armstrong M. J. Diagnosis and Treatment of Parkinson's Disease / M. J. Armstrong, M. S. Okun // *Journal of the American Medical Association*. – 2020. – Vol. 323. – № 6. – P. 548-560.
24. Oshi M. A. Colon-targeted dexamethasone microcrystals with pH-sensitive chitosan/ alginate/ Eudragit S multilayers for the treatment of inflammatory bowel disease / M. A. Oshi, M. Naeem, J. Bae., J. Kim, J. Lee, N. Hasan, W. Kim, E. Im, Y. Jung, J.W. Yoo // *Carbohydrate Polymers*. – 2018 – Vol. 198. – P. 434-442.
25. Lee A. Dexamethasone-loaded Polymeric Nanoconstructs for Monitoring and Treating Inflammatory Bowel Disease / A. Lee, C. De Mei, M. Ferreira, R. Marotta, H. Y. Yoon, K. Kim, I. C. Kwon, P. Decuzzi // *Theranostics*. – 2017. – Vol. 7. – № 15. – P. 3653-3666.
26. Shen K. N. Doxycycline combined with bortezomib-cyclophosphamide-dexamethasone chemotherapy for newly diagnosed cardiac light-chain amyloidosis: a multicenter randomized controlled trial / K. N. Shen, W. J. Fu, Y. Wu, Y. J. Dong, Z. X. Huang, Y. Q. Wei, C. R. Li, C. Y. Sun, Y. Chen, H. L. Miao, Y. L. Zhang, X. X. Cao, D. B. Zhou, J. Li // *Circulation*. – 2022. – Vol. 145. – № 1. – P. 8-17.
27. Toledano-Osorio M. Doxycycline-doped collagen membranes accelerate in vitro osteoblast proliferation and differentiation / M. Toledano-Osorio, E. de Luna-Bertos, M. Toledano, F. J. Manzano-Moreno, V. Costela-Ruiz, C. Ruiz, J. Gil, R. Osorio // *Dental Materials*. – 2023. – Vol. 39. – № 6. – P. 616-623.
28. Toledano-Osorio M. Dexamethasone and Doxycycline Doped Nanoparticles Increase the Differentiation Potential of Human Bone Marrow Stem Cells / M. Toledano-Osorio, S. López-García, R. Osorio, M. Toledano, D. García-Bernal, S. Sánchez-Bautista, F. J. Rodríguez-Lozano // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 9. – P. 1865.
29. Глухарева Т. В. Основы получения и применения антибиотиков : учебное пособие. Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, Уральский федеральный университет / Т. В. Глухарева, И. С. Селезнева, Е. Н. Уломский – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, – 2021. 150 с.
30. Шабаров Ю. С. Органическая химия: В 2-х кн.: Циклические соединения: Учебник для вузов / Ю.С. Шабаров - Москва: Химия, – 1994. 848 с.

Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

**Баева Елена Сергеевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры нормальной физиологии
E-mail: galaxy1985@mail.ru*

*Воронежский государственный университет
Артюхов Валерий Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии*

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

N.N. Burdenko State Medical University

**Bayeva Yelena S., PhD, Associate Professor,
Department of Normal Physiology
E-mail: galaxy1985@mail.ru*

Voronezh State University

*Artyukhov Valery G., PhD, DSci, Full Professor,
Head of the Department of Biophysics and Biotechnology*

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

THE USE OF UV SPECTROPHOTOMETRY IN ASSESSING THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF HUMAN OXYHEMOGLOBIN IN THE PRESENCE OF MEXIDOL, DEXAMETHASONE AND DOXYCYCLINE IN VITRO

Ye. S. Bayeva^{1*}, V. G. Artyukhov²

¹*Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko*

²*Voronezh State University*

Abstract. Pharmacokinetics, bio-distribution and biological activity of substances are the key parameters determining the success or failure of the therapy. Many developments aimed at improving the

effectiveness of drugs *in vivo* are aimed at modulating their concentration or bio-distribution in tissues, cells or subcellular structures. Erythrocyte-based delivery systems are particularly effective for maintaining active doses of drugs in the circulating blood, releasing them for several days or weeks. Identifying the features and nuances of biocompatibility of representatives of various classes of compounds is an urgent task. The aim of this work was to study the combined effect of mexidol, doxycycline hydrochloride and dexamethasone on the state of human oxyhemoglobin. UV spectrophotometry has demonstrated that the compounds studied are characterized by unique absorption bands characteristic of their functionally active groups: doxycycline - 272 and 345 nm, mexidol – 200 and 295 nm, dexamethasone – 242 nm. The combined presence of mexidol and doxycycline, as well as dexamethasone and doxycycline in the incubation medium leads to partial screening of phenolic groups of doxycycline. Mexidol and dexamethasone in therapeutic concentration do not cause significant differences in the oxyhemoglobin molecules relative to the control – native hemoprotein. Doxycycline alone, as well as in combination with mexidol, contributes to the redistribution of electron density in oxyhemoglobin molecules, mainly affecting its heme component. Presumably, the complexation of antibiotic with hemoglobin occurs at the level of the heme pocket, which causes a wave of conformational transformations and thereby restricts access to endogenous oxidants, preventing methemoglobin formation. The magnitude of peaks and their position in the long-wavelength regions of the electronic absorption spectra of aqueous solutions of oxyhemoglobin did not undergo statistically significant changes, in contrast to the hyperchromic effect recorded at 274 and 345 nm, which indicates a change in the optical density of the medium. In view of the discovered effects of the interaction of the studied drugs with human oxyhemoglobin, it is recommended to observe the time interval between their injections into the human body to maintain an effective oxygen transport function.

Keywords: UV spectrophotometry, oxyhemoglobin, mexidol, dexamethasone, doxycycline hydrochloride, electronic absorption spectrum

REFERENCES

- Rossi L. Engineering erythrocytes for the modulation of drugs' and contrasting agents' pharmacokinetics and biodistribution / L. Rossi, F. Pierigè, A. Antonelli, N. Bigini, C. Gabucci, E. Peiretti, M. Magnani // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2016. – Vol. 106(Pt A). – P. 73-87.
- Annese V. Erythrocytes-mediated delivery of dexamethasone in steroid-dependent IBD patients-a pilot uncontrolled study / V. Annese, A. Latiano, L. Rossi, G. Lombardi, B. Dallapiccola, S. Serafini, G. Damonte, A. Andriulli, M. Magnani // *American Journal of Gastroenterology*. – 2005. – Vol. 100. – No 6. – P. 1370-1375.
- Mambrini G. Red Blood Cell Membrane Processing for Biomedical Applications / G. Mambrini, M. Mandolini, L. Rossi, F. Pierigè, G. Capogrossi, P. Salvati, S. Serafini, L. Benatti, M. Magnani // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2017. – Vol. 517. – No 1-2. – P. 175-184.
- Coker S. A. A Study of the Pharmacokinetic Properties and the In Vivo Kinetics of Erythrocytes Loaded With Dexamethasone Sodium Phosphate in Healthy Volunteers / S. A. Coker, Z. M. Szczepiorkowski, A. H. Siegel, A. Ferrari, G. Mambrini, R. Anand, R. D. Hartman, L. Benatti, L. J. Dumont // *Transfusion Medicine Reviews*. – 2018. – Vol. 32. – No 2. – P. 102-110.
- Voronina T. A. Effects of mexidol in patients with chronic brain ischemia and chronic heart failure (II-III functional class) / T. A. Voronina, E. A. Ivanova // *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. – 2019. – Vol. 119. – No 4. – P.115-124.
- Shamrey V.K. The possibilities of using Mexidol in the complex therapy of psychological disorders / V. K. Shamrey, E. S. Kurasov, V. V. Nechiporenko, A. I. Kolchev, N. V. Tsygan // *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. – 2020. – Vol. 120. – No 5. – P. 160-164.
- Shchulkin A. V. A modern concept of antihypoxic and antioxidant effects of mexidol / A. V. Shchulkin // *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. – 2018. – Vol. 118. – No 12-2. – P. 87-93.
- Siprov A. V. Morphofunctional State of Erythrocytes in Rats with Walker-256 Carcinoma Treated with Docetaxel and Xymedon / A. V. Siprov, M. A. Solovyova // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2017. – Vol. 164. – No 1. – P. 44-48.
- Plotnikov D. M. Evaluation of blood rheology by patients with acute ischemic stroke with Mexidol administration / D. M. Plotnikov, M. N. Stegmeier, O. I. Aliev // *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. – 2019. – Vol. 119. – No 3(2). – P. 76-82.
- Makletsova M. G. The effect of antioxidants on *in vivo* and *in vitro* methemoglobin formation in erythrocytes of patients with Parkinson's disease / M. G. Makletsova, G. T. Rikhireva, V. V. Poleshuk, K. V. Grjakalov, S. L. Timerbaeva, T. N. Fedorova // *Biomeditsinskaya Khimiya*. – 2016. – Vol. 62. – No 2. – P. 193-197.

11. Gromova O. A. Opyt primeneniya meksidola v nevrologicheskoi praktike / O. A. Gromova, I. Yu. Torshin, L. V. Stakhovskaya, E. N. Pepelyaev, V. A. Semenov, A. G. Nazarenko // Zhurnal nevrologii i psikiatrii. – 2018. – No 10. – S. 94 – 104.
12. Shchukin I. A. Neuroprotective therapy with citicoline (Ceraxon) in patients with ischemic stroke / I. A. Shchukin, M. S. Fidler, I. A. Koltsov, A. Y. Suvorov // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2022. – No 52(5). – P. 649-656.
13. Hadjimichael A. C. The antineoplastic effect of doxycycline in osteosarcoma as a metalloproteinase (MMP) inhibitor: a systematic review / A. C. Hadjimichael, A. F. Foukas, O. D. Savvidou, A. F. Mavrogenis, A. K. Psyri, P. J. Papagelopoulos // Clinical Sarcoma Research. – 2020. – No 30. – P. 10:7.
14. Alexander-Savino C. V. Doxycycline is an NF- κ B inhibitor that induces apoptotic cell death in malignant T-cells / C. V. Alexander-Savino, M. S. Hayden, C. Richardson, J. Zhao, B. Poligone // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7. – No 46. – P. 75954 – 75967.
15. Markowska A. Doxycycline, salinomycin, monensin and ivermectin repositioned as cancer drugs / A. Markowska, J. Kaysiewicz, J. Markowska, A. Huczynski // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2019. – Vol. 29. – No 13. – P. 1549-1554.
16. Lamb R. Doxycycline down-regulates DNA-PK and radiosensitizes tumor initiating cells: Implications for more effective radiation therapy / R. Lamb, M. Fiorillo, A. Chadwick, B. Ozsvari, K. J. Reeves, D. L. Smith, R. B. Clarke, S. J. Howell, A. R. Cappello, U. E. Martinez-Outschoorn, M. Peiris-Pagès, F. Sotgia, M. P. Lisanti // Oncotarget. – 2015. – Vol. 10. – No 6(16). – P.14005-14025.
17. Babaskina A. I. Analiz vozdeistviya nekotorykh solei doksitsiklina na strukturnoe sostoyanie eritrotsitov i gemoglobina cheloveka / A. I. Babaskina, E. S. Baeva, V. G. Artyukhov // Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya. – 2021. – No 2. – S. 62-68.
18. Baeva E. S. Nauka. Issledovaniya. Praktika : sbornik izbrannykh statei po materialam Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii, Sankt-Peterburg, 25 dekabrya 2020 goda / E. S. Baeva, O. I. Tyunina, A. I. Babaskina – Sankt-Peterburg: «NATsRAZVITIE», 2020. – S. 13-15.
19. Volchegorskii I. A. Vliyanie proizvodnykh 3-oksipiridina i yantarnoi kisloty na fizicheskuyu rabotosposobnost' myshei i ikh ustoichivost' k ostroi gipoksii razlichnogo geneza / I. A. Volchegorskii, I. Yu. Miroshnichenko, L. M. Rassokhina // Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova. – 2016. – T. 102. – No 11. – S. 1312-1322.
20. Volchegorskii I. A. Vliyanie proizvodnykh 3-oksipiridina i yantarnoi kisloty na ustoichivost' k ostroi tserebral'noi ishemii (eksperimental'noe issledovanie) / I. A. Volchegorskii, I. Yu. Miroshnichenko, L. M. Rassokhina // Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. C.C. Korsakova. – 2014. – T. 114. – No 12. – S. 123-127.
21. Noreen S. Dexamethasone: Therapeutic potential, risks, and future projection during COVID-19 pandemic / S. Noreen, I. Maqbool, A. Madni // European journal of pharmacology. – 2021. – Vol. 894. – P. 173854.
22. Namazi N. The effectiveness of dexamethasone as a combination therapy for COVID-19 / N. Namazi // Acta Pharmaceutica. – 2022. – Vol. 72. – No 3. – P. 345-358.
23. Armstrong M. J. Diagnosis and Treatment of Parkinson's Disease / M. J. Armstrong, M. S. Okun // Journal of the American Medical Association. – 2020. – Vol. 323. – No 6. – P. 548-560.
24. Oshi M. A. Colon-targeted dexamethasone microcrystals with pH-sensitive chitosan/ alginate/ Eudragit S multilayers for the treatment of inflammatory bowel disease / M. A. Oshi, M. Naeem, J. Bae., J. Kim, J. Lee, N. Hasan, W. Kim, E. Im, Y. Jung, J.W. Yoo // Carbohydrate Polymers. – 2018. – Vol. 198. – P. 434-442.
25. Lee A. Dexamethasone-loaded Polymeric Nanoconstructs for Monitoring and Treating Inflammatory Bowel Disease / A. Lee, C. De Mei, M. Ferreira, R. Marotta, H. Y. Yoon, K. Kim, I. C. Kwon, P. Decuzzi // Theranostics. – 2017. – Vol. 7. – No 15. – P 3653-3666.
26. Shen K. N. Doxycycline combined with bortezomib-cyclophosphamide-dexamethasone chemotherapy for newly diagnosed cardiac light-chain amyloidosis: a multicenter randomized controlled trial / K. N. Shen, W. J. Fu, Y. Wu, Y. J. Dong, Z. X. Huang, Y. Q. Wei, C. R. Li, C. Y. Sun, Y. Chen, H. L. Miao, Y. L. Zhang, X. X. Cao, D. B. Zhou, J. Li // Circulation. – 2022. – Vol. 145. – No 1. – P. 8-17.
27. Toledano-Osorio M. Doxycycline-doped collagen membranes accelerate in vitro osteoblast proliferation and differentiation / M. Toledano-Osorio, E. de Luna-Bertos, M. Toledano, F. J. Manzano-Moreno, V. Costela-Ruiz, C. Ruiz, J. Gil, R. Osorio // Dental Materials. – 2023. – Vol. 39. – No 6. – P. 616-623.
28. Toledano-Osorio M. Dexamethasone and Doxycycline Doped Nanoparticles Increase the Differentiation Potential of Human Bone Marrow Stem Cells / M. Toledano-Osorio, S. López-García, R.

Osorio, M. Toledano, D. García-Bernal, S. Sánchez-Bautista, F. J. Rodríguez-Lozano // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – No 9. – P. 1865.

29. Glukhareva T. V. *Osnovy polucheniya i primeneniya antibiotikov : uchebnoe posobie*. Ministerstvo nauki i vysshego obrazovaniya Rossiiskoi Federatsii, Ural'skii federal'nyi universitet / T. V.

Glukhareva, I. S. Selezneva, E. N. Ulomskii – Ekaterinburg : Izd-vo Ural. un-ta, – 2021. 150 s.

30. Shabarov Yu. S. *Organicheskaya khimiya: V 2-kh kn.: Tsiklicheskie soedineniya: Uchebnik dlya vuzov* / Yu.S. Shabarov - Moskva: Khimiya, – 1994. 848 s.