

А.В.ПОЛИЩУК, Э.Т.КАРАСЕВА, В.Е.КАРАСЕВ

## Антимикробная активность и фототоксичность фторхинолонов при УФ-облучении

*Проведен анализ результатов исследований фотохимических свойств антибиотиков класса фторхинолонов и их фототоксичности. Исследованы антибактериальные свойства соединений ряда металлов с ципрофлоксацином (cfqH) и норфлоксацином (nfqH). Оценена степень снижения антибактериальной активности ципрофлоксацина и норфлоксацина при ультрафиолетовом облучении.*

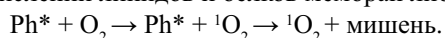
**Antibacterial activity and phototoxicity of fluoroquinolones.** A.V.POLISHCHUK, E.T.KARASEVA, V.E.KARASEV (Institute of Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

*Results of investigation of photochemical properties and phototoxicity of fluoroquinolones were analyzed. Antibacterial properties of ciprofloxacin (cfqH) and norfloxacin (nfqH) complexes with different metals were studied. Reduction of antibacterial activity of ciprofloxacin and norfloxacin under UV-irradiation was estimated.*

Особое место среди синтетических антимикробных препаратов занимают производные хинолон-3-карбоновой кислоты, широко применяющиеся в клинической практике. В последние годы эти соединения привлекают все более и более пристальное внимание исследователей. Механизмы действия хинолонов на бактериальную клетку и процессы, лежащие в основе их фототоксичности, недостаточно изучены, поэтому необходимы всесторонние фундаментальные исследования физических, химических и антибактериальных свойств этих веществ. Кроме того, массовое производство этих соединений делает актуальным изучение альтернативных областей их применения, в частности с целью рациональной утилизации выбракованных веществ, подверженных влиянию света.

До сих пор остается большой проблемой проявление фторхинолонами, входящими в группу хинолонов, фототоксичных свойств в условиях избыточной инсоляции и УФ-облучения. Хотя точный механизм фототоксичности фторхинолонов до сих пор остается неизвестным, возможны несколько процессов [7, 8].

1. Перенос энергии с возбужденного триплетного уровня фотосенсибилизатора (Ph) на кислород с образованием синглетного кислорода, который в свою очередь участвует в окислении липидов и белков мембран либо разрушении ДНК:



2. Перенос электрона или протона может вести к образованию свободных радикалов, напрямую атакующих биомолекулы, либо в присутствии кислорода они образуют пероксид-радикалы или высокореактивные гидроксил-радикалы, которые участвуют в окислительном разрушении ДНК и других биомолекул. Этот последний путь соотносится с последовательными реакциями, которые включают в себя появление радикалов супероксид-анионов, их дисмутация формирует пероксид водорода с последующим образованием гидроксил-радикала, хотя роль фторхинолонов в процессе их образования еще не ясна.

ПОЛИЩУК Анна Владимировна – кандидат химических наук, КАРАСЕВА Эмилия Тойвовна – кандидат химических наук, КАРАСЕВ Владимир Егорович – доктор химических наук (Институт химии ДВО РАН, Владивосток).

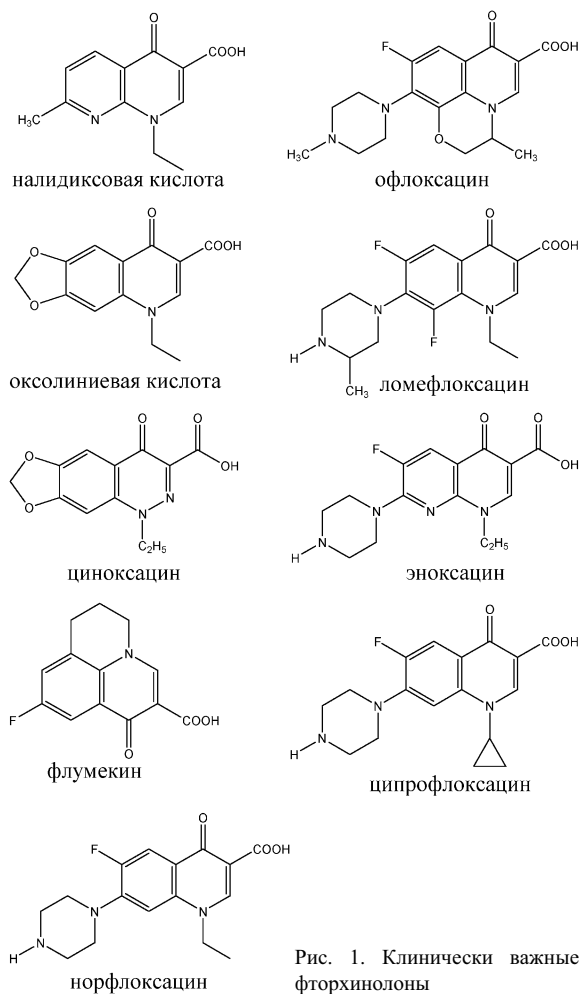


Рис. 1. Клинически важные фторхинолоны

их фототоксичности и антибактериального действия. Ранее установлено, что фотохимическое разложение налидиксовой кислоты в щелочных растворах ведет к отщеплению  $\text{COOH}$ -группы [6]. Изучены лазерный фотолиз ( $\lambda = 355 \text{ нм}$ ) и соответствующая фоточувствительность налидиксовой кислоты. Фотолиз налидиксовой кислоты в водной среде с  $\text{pH } 9,2$  ведет к образованию налидиксат-аниона в триплетном состоянии с квантовым выходом ( $\Phi_T \geq 0,6$ ) [13].

Высокоэффективный фотолиз (320 нм,  $\text{pH } 7,4$ ) ломефлоксацина и флерофлоксацина вызван потерей фтора в положении 8 с образованием фторид-иона. Норфлоксацин и ципрофлоксацин, которые являются монофторированными молекулами, напротив, не генерируют фторид-ион при облучении [10]. Это объясняет, почему ломефлоксацин и флерофлоксацин более фотомутагенны и фотоканцерогенны, чем фторхинолоны, в которых нет фтора в этом положении.

Присутствие кислорода не оказывает влияния на фототоксичность фторхинолонов. При этом спектры поглощения ломефлоксацина в анаэробных и аэробных условиях практически идентичны [9].

Нами впервые исследовано влияние на антибактериальную активность ципрофлоксацина ( $\text{cfqH}$ ) и норфлоксацина ( $\text{nfqH}$ ) присутствия различных количеств иона  $\text{Eu(III)}$ , выбранного в качестве люминесцирующего зонда, описанное в работе [2].

3. Образование ковалентной связи в результате фотореакции сенсibilизатора и биомолекулы.

4. Деструкция фотосенсibilизатора с образованием фотопродуктов (например, карбена и арильного радикала), которые могут действовать как токсины либо как новые фотосенсibilизаторы.

Фототоксичность фторхинолонов связана с их структурными особенностями [3, 5, 12] (рис. 1). Галогенированные фторхинолоны (ломефлоксацин) провоцируют более сильные кожные реакции по сравнению с 8-метокси-производными [11], что вызвано, возможно, дефторированием молекулы с образованием атома фтора или высокорективного карбена. Дефторирование протекает через стадию триплетного состояния, соответствующего цвиттер-ионным формам. Присутствие электронодонорного заместителя в молекуле фторхинолона дает фотостабильность галогенированному заместителю в положении 8 и снижает фототоксичность [7].

Изучение фотохимических реакций фторхинолонов представляется важным для понимания механизма

Показано, что ионы европия при введении их в составе хлоридов не задерживают роста микробных культур. При разных концентрациях европия для всех исследованных культур активность cfqH в присутствии Eu(III) оказалась сопоставимой с исходным cfqH. Диаметр зоны подавления роста микроорганизмов во всех случаях был выше 21 мм, что соответствует высокой чувствительности микроорганизма к препарату [4].

В отличие от cfqH, для nfqH наблюдается некоторое снижение активности с ростом концентрации европия. По-видимому, комплекс европия с норфлоксацином менее подвержен диссоциации в присутствии компонентов питательной среды АГВ на основе агара, чем комплекс цiproфлорксацина. За счет этого связанный металлом фторхинолон проявляет более низкую антибактериальную активность, так как процесс комплексообразования с металлом, вероятно, конкурирует с взаимодействием с ДНК-гиразой бактериальной клетки. Люминесцентное исследование питательных сред в процессе тестирования показало, что интенсивность люминесценции иона европия с cfqH в среде АГВ снижается практически до нуля, а с nfqH частично сохраняется.

Введение в структуру хинолона заместителей C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> или C<sub>3</sub>H<sub>5</sub> с различными донорными свойствами приводит к перераспределению электронной плотности по пиридиновою кольцу, что сказывается на зарядовой составляющей атомов кислорода, входящих во внутреннюю координационную сферу Eu(III) при комплексообразовании, и, как следствие, на антибактериальной активности близких по строению соединений.

Результаты наших экспериментов по изучению влияния ионов Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Ba<sup>2+</sup> на антибактериальную активность фторхинолонов были подобны результатам, полученным с Eu(III). При введении хлоридов или нитратов этих металлов задержки роста изученных микробных культур не наблюдалось. Активность cfqH при добавлении солей указанных металлов вплоть до концентрации 50 мг/мл оказалась сопоставимой с активностью чистого cfqH. Диаметр зоны подавления роста микроорганизмов во всех случаях был выше 21 мм, что говорит о высокой чувствительности микроорганизмов к данному антибиотику. Норфлоксацин показал некоторое снижение активности с ростом концентрации солей металлов.

Проведены эксперименты по изучению влияния УФ-облучения на антибактериальную активность cfqH и nfqH. Активность цiproфлорксацина при увеличении времени облучения раствора антибиотика до 60 мин оказалась сопоставимой с необлученным cfqH или несколько снижалась. Снижение активности для *Proteus vulgaris* и *Staphylococcus aureus* более выражено (см. таблицу).

**Антибактериальная активность облученных cfqH и nfqH**

ФХ	Время облучения (λ = 254 нм), мин	Концентрация ФХ, мг/ 50 мл	Диаметр зоны подавления роста микроорганизмов для культур, мм			
			<i>Escherichia coli</i> (Гр-)	<i>Proteus vulgaris</i> (Гр-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Гр-)	<i>Staphylococcus aureus</i> (Гр+)
cfqH	0	10	34	25	30	22
	10	10	30	22	25	20
	20	10	30	22	25	20
	30	10	30	22	25	20
	60	10	28	0	24	11
nfqH	0	10	25	20	20	0
	10	10	20	17	17	0
	20	10	17	11	0	0
	30	10	0	0	0	0
	60	10	0	0	0	0

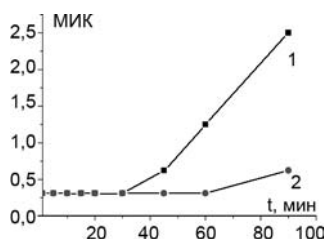


Рис. 2. Зависимость изменения МИК cfqH от времени облучения и длины волны: 1 –  $\lambda = 254$  нм, 2 –  $\lambda = 366$  нм

В отличие от cfqH, активность более фотореактивного nfqH с ростом продолжительности облучения резко снижается, диаметр зоны подавления роста всех микроорганизмов меньше 21 мм уже после 10–20 мин облучения препарата. Это коррелирует с данными по исследованию фотохимической устойчивости nfqH, проявляющим большую склонность к димеризации и декарбоксилации молекулы. Эти процессы приводят к изменению и разрушению функциональных групп фрагмента пиридона, ответственного за антибактериальную активность антибиотиков группы фторхинолонов. За счет этого у nfqH более низкая антибактериальная активность.

В ходе эксперимента обнаружено, что минимальная ингибирующая концентрация (МИК) увеличивается пропорционально времени облучения, начиная с 30 мин (рис. 2).

Как показал эксперимент, при облучении водных растворов фторхинолонов количество нейтральных форм молекул, обладающих антибактериальной активностью, уменьшается, что согласуется с изменениями значений МИК при облучении [1, 3].

Таким образом, световое излучение влияет на биологическую активность фторхинолонов, связанную с наличием в их химической структуре функциональных групп, способных протонироваться-депротонироваться под влиянием различных факторов.

Для понимания этого процесса требуется расширение фундаментальных исследований электрон-протонных взаимодействий между активным веществом и биологической системой на молекулярном уровне.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мокрушина Г.А., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н. Взаимосвязь структуры и антибактериальной активности в ряду фторхинолонов // Хим.-фарм. журн. 1995. Т. 29, № 9. С. 5-19.
2. Полищук А.В., Карасева Э.Т., Медков М.А., Карасев В.Е. Спектрально-люминесцентные свойства и антибактериальная активность соединений европия (III) с ципрофлоксацином и норфлоксацином // Коорд. химия. 2004. Т. 30, № 11. С. 877-880.
3. Потемкин В.А., Гришина М.А., Белик А.В., Чупахин О.Н. Исследование количественной взаимосвязи структура – антибактериальная активность производных хинолона // Хим.-фарм. журн. 2002. Т. 36, № 1. С. 22-25.
4. Сбойчаков В.Б., Волков И.И., Суборова Т.Н. Клинические испытания дисков для определения чувствительности микроорганизмов к противомикробным лекарственным средствам. СПб.: Анатолия, 2000. 6 с.
5. Castillo-Blum S.E., Barba-Behrens N. Coordination chemistry of some biologically active ligands // Coord. Chem. Rev. 2000. Vol. 196. P. 3-30.
6. Detzer N., Huber B. Photochemie heterocyclischer Enone I, Photolyse und Thermolyse von Nalidixinsäure // Tetrahedron. 1975. Vol. 31. P. 1937-1941.
7. Foote C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation // Photochem. Photobiol. 1991. Vol. 54. P. 659.
8. Martínez L.J., Sik R.H., Chignell C.F. Fluoroquinolone antimicrobials: singlet oxygen, superoxide and phototoxicity // Photochem. Photobiol. 1998. Vol. 67. P. 399-403.
9. Martinez L., Chignell C.F. Photocleavage of DNA by the fluoroquinolones antibacterials // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 1998. Vol. 45. P. 51-59.
10. Martínez L.J., Li G., Chignell C.F. Photogeneration of fluoride by the fluoroquinolone antimicrobial agents lomefloxacin and fleroxacin // Photochem. Photobiol. 1997. Vol. 65. P. 599-602.
11. Miolo G., Viola G., Vedaldi D., Dall'Acqua F., Fravolini A., Tabarrini O., Cecchetti V. In vitro phototoxic properties of new 6-desfluoro- and 6-fluoro-8-methylquinolones // Toxicology in vitro. 2002. Vol. 16. P. 683-693.
12. Park H.R., Kim T.H., Bark K.M. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments // Eur. J. Med. Chem. 2002. Vol. 37. P. 443-460.
13. Vermeersch G., Ronfard-Haret J.C., Bazin M., Carillet V., Morliere P., Santus R. Type I and type II photosensitization by the antibacterial drug nalidixic acid. A laser flash photolysis study // Photochem. Photobiol. 1991. Vol. 54. P. 661-666.