

## ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ $\beta$ -ЦИКЛОДЕКСТРИНА С ЛЕВОФЛОКСАЦИНОМ И ЦЕФТРИАКСОНОМ КАК ПОДХОД К РЕГУЛЯЦИИ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 2023 г. Л. Р. Якупова<sup>1</sup> \*, Т. Ю. Копнова<sup>1</sup>, А. А. Скуредина<sup>1</sup>, И. М. Ле-Дейген<sup>1</sup>, П. Н. Шустров<sup>2</sup>, А. М. Новоселов<sup>1</sup>, Е. В. Кудряшова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Москва, 119296 Россия

<sup>2</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: Yakupova.Linara@mail.ru

Поступила в редакцию 15.05.2022 г.

После доработки 04.08.2022 г.

Принята к публикации 25.08.2022 г.

Исследовано комплексообразование гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрина (ГПЦД) с антибактериальными препаратами: цефтриаксоном (ЦТ) и левофлоксацином (ЛВ), которые используются для лечения респираторных заболеваний, в том числе и в терапии бактериальной инфекции дыхательных путей. Методом ИК-спектроскопии Фурье и ЯМР спектроскопии показано, что комплекс ЛВ–ГПЦД образуется преимущественно за счет погружения ароматического фрагмента ЛВ внутрь полости ГПЦД; в то время как комплекс ЦТ–ГПЦД реализуется на поверхности ГПЦД. ЛВ, как более гидрофобная молекула, образует в 10 раз более прочные комплексы с ГПЦД, чем ЦТ:  $K_{\text{дисЛВ-ГПЦД}} \sim 10^{-3}$  М и  $K_{\text{дисЦТ-ГПЦД}} \sim 10^{-2}$  М при рН 7.4. Показано, что для однозаряженных форм препаратов комплексы стабильнее в 2 раза. С применением метода флуоресцентной спектроскопии исследованы термодинамические параметры взаимодействия лекарственных форм с человеческим сывороточным альбумином. Отрицательные значения  $\Delta H$  и  $\Delta S$  реакции свидетельствуют об образовании как водородных связей, так и вандерваальсовых взаимодействий при комплексообразовании обоих лекарств с ЧСА. Установлено, что белок в  $\sim 4$  раза прочнее связывается с ЛВ при 37°C, по сравнению с ЦТ. Полученные данные позволяют усовершенствовать характеристики исследованных препаратов и вывести на новый уровень методы борьбы с тяжелыми формами респираторных заболеваний.

DOI: 10.31857/S0023291222600183, EDN: KFMUJY

### ВВЕДЕНИЕ

В последнее время неизменно возрастает необходимость терапии тяжелых форм респираторных заболеваний, которые могут быть вызваны в том числе и осложнениями при протекании различных вирусных заболеваний, например, COVID-19. На сегодняшний день большинству пациентов, поступающих в стационар с диагнозом “пневмония тяжелого течения”, до определения этиологии заболевания назначается антибактериальная терапия в упреждающем режиме. Для ее проведения используется ряд антимикробных молекул (АМ): фторхинолоны (III и IV поколения), амоксицилин/клавулановая кислота, цефалоспорины III (цефотаксим, цефтриаксон), цефтаролинфосамил, меропенем [1, 2]. К сожалению, все применяемые в клинической практике препараты не лишены недостатков, таких как ограниченная растворимость,

низкая биодоступность и высокая вероятность возникновения побочных эффектов [3, 4]. Таким образом, увеличивается актуальность разработки новых лекарственных форм антибактериальных препаратов, которые позволят усовершенствовать эффективность терапии и улучшить фармакокинетические и фармакодинамические параметры лекарств за счет изменения их физико-химических свойств. Особый интерес представляют системы доставки на основе нековалентных комплексов производных  $\beta$ -циклодекстринов (ЦД) с антибактериальными препаратами.

Перспективными носителями для лекарственных молекул, прекрасно зарекомендовавшими себя в медицине, являются ЦД, которые представляют собой семейство циклических олигосахаридов, состоящих из остатков D-глюкопиранозы [5]. ЦД получили широкое распространение в фармацев-

тической промышленности, поскольку они способны увеличивать растворимость препаратов и снижать их токсичность путем формирования нековалентных комплексов включения по механизму “гость–хозяин”. Помимо этого, комплексобразование с ЦД способствует улучшению стабильности лекарственных молекул и позволяют создавать формуляции с заданными фармакокинетическими характеристиками [6, 7]. Важными преимуществами ЦД являются их доступность, небольшая стоимость и крайне низкая токсичность для живых организмов [8]. Среди представителей класса ЦД наибольшее применение в медицинской практике находит гидроксипропил-ЦД (ГПЦД), поскольку он обладает лучшей растворимостью среди производных ЦД [7].

Для изучения эффективности систем доставки АМ в данной работе были исследованы представители двух классов антибиотиков: цефтриаксон и левофлоксацин, которые активно используются для лечения различных видов инфекций.

Цефалоспорины – второй по величине класс  $\beta$ -лактамов антибиотиков, обладающих широким спектром активности против как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [9]. Механизм действия цефалоспоринов основан на инактивации бактериальной транспептидазы, фермента, который отвечает за синтез клеточной стенки микроорганизма. Наиболее востребованным представителем данного класса антибиотиков является цефтриаксон (ЦТ), который представляет собой полусинтетический препарат третьего поколения. Преимуществом ЦТ является его способность проникать через гематоэнцефалический барьер, что значительно расширяет спектр его применения и выделяет на фоне других лекарственных молекул [9]. Несмотря на высокую эффективность ЦТ его применение может быть ограничено ввиду низкой стабильности, что обусловлено склонностью амидной связи  $\beta$ -лактамового кольца к гидролизу. Это создает трудности при хранении и непосредственной подготовке к применению препарата. Более того, единственным способом введения ЦТ является парентеральное, что значительно усложняет терапию.

Еще одним важным классом антибактериальных препаратов являются фторхинолоны, которые повсеместно применяются в клинической практике, поскольку обладают широким спектром активности, который включает грамотрицательные и грамположительные аэробные и анаэробные бактерии [10]. Фторхинолоны отличаются высокой химической и биологической стабильностью и разнообразием способов введения. Их бактериальная активность реализуется за счет избирательного ингибирования ДНК-гиразы (топоизомеразы II типа) и топоизомеразы IV, что влечет за собой остановку процесса репликации ДНК микроорганиз-

мов и, как следствие, их деления, при этом ДНК клеток млекопитающих не затрагивается ввиду высокой специфичности фторхинолонов к бактериальным ферментам [3]. Левофлоксацин (ЛВ) является препаратом III поколения фторхинолонов и характеризуется большей антибактериальной активностью в сравнении с представителями фторхинолонов более ранних поколений. Несмотря на все преимущества фторхинолонов, продолжительный курс лечения и высокие дозировки препарата могут быть причиной возникновения побочных эффектов [11].

Таким образом, актуальной задачей является минимизация побочных эффектов и увеличение стабильности, биодоступности АМ путем создания высокоэффективных систем доставки.

Для успешного применения комплексов АМ-ЦД в медицинской практике необходимо изучить параметры их взаимодействия с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), поскольку ЧСА является преобладающим белком в плазме крови человека [12]. Его основной функцией является транспорт различных молекул, например, гормонов, жирных кислот и лекарственных молекул [13, 14]. Связывание с белками является одной из важнейших физико-химических характеристик препаратов, поскольку именно белки отвечают за доставку биологически активных молекул к очагу инфекции [15].

В данной работе получены и исследованы комплексы ЦД с препаратами разных классов ЛВ и ЦТ, изучено влияние комплексобразования с ЦД на эффективность и термодинамические параметры связывания АМ с ЧСА. Полученные результаты важны для оценки возможностей влияния систем доставки на фармакокинетические и фармакодинамические свойства лекарственных молекул и, как следствие, улучшения эффективности терапии тяжелых дыхательных инфекций.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Материалы*

2-Гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин, левофлоксацин, цефтриаксона натриевая соль, человеческий сывороточный альбумин – Sigma-Aldrich (США), таблетки для приготовления натрий-фосфатного солевого буферного раствора – ЭкоСервис (Россия), соляная кислота – Реахим (Россия).

### *Методы*

*Получение комплексов лекарственных препаратов – гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин:* к раствору антибактериального препарата (АМ) с концентрацией 2 и 10 мМ для ЛВ и ЦТ соответственно в натрий фосфатном буфере (рН 7.4) или солянокислом буфере (рН 2.0) добавляли ~~требуемое количество~~

раствора ГПЦД в соответствующем в количестве, необходимом для получения комплексов с мольным соотношением АМ : ГПЦД от 1 : 0.25 до 1 : 5. Комплексы инкубировали в течение часа при температуре 37°C.

*Получение комплексов человеческого сывороточного альбумина с лекарственной формой:* к раствору ЧСА в фосфатном буфере (рН 7.4) добавляли требуемое количество раствора АМ или комплекса АМ–ГПЦД с тем же рН и доводили объем раствора буфером до 1 мл. Концентрация ЧСА поддерживалась постоянной во всех образцах и была равна 0.02 мМ, мольный избыток АМ и АМ–ГПЦД варьировался в интервале от 0.3 до 7. Комплексы инкубировали при перемешивании в течение 1 ч в температурном диапазоне от 25°C до 37°C.

*УФ-спектры* регистрировали на приборе Amer-Sharm Biosciences UltraSpec 2100 pro (США) трижды в диапазоне 200–400 нм в кварцевой кювете Hellma 100-QS с оптическим путем 10 мм. Растворы лекарственных препаратов готовили в натрий-фосфатном водном солевом буфере, концентрации веществ составляли  $\sim 10^{-6}$ – $10^{-5}$  М, исследование проводили при 25°C.

*ИК-спектры* регистрировали на ИК-спектрометре Фурье Tensor 27 Bruker (Германия), оснащенном МСТ-детектором, охлаждаемым жидким азотом, с термостатом Huber (США). Образец объемом 40 мкл помещали на кристалл однократного отражения (ZnSe) термостатируемой ячейки (НПВО, BioATR-II, Bruker, Германия). Измерения проводили при постоянной скорости продувки сухим воздухом (Jun-Air, Германия). ИК-спектры фона и образцов регистрировали трижды в интервале от 3000 до 950  $\text{см}^{-1}$  с разрешением 1  $\text{см}^{-1}$ , далее производили 70-кратное сканирование и усреднение в программе Opus 7.0. При исследовании комплексов АМ–ГПЦД в качестве фона регистрировали ИК-спектр ГПЦД в заданной концентрации. Растворы АМ и АМ–ГПЦД готовили в натрий-фосфатном или солянокислом буферном растворе для рН 7.4 и 2.0 соответственно, спектры регистрировали при 25°C.

*Расчет констант по Уравнению Скэтчарда:* для определения  $K_{\text{dis}}$  применялось уравнение линеаризации в координатах Скэтчарда:

$$\frac{[\text{ЦД}]_{\text{связанный}}}{[\text{ЦД}]_{\text{свободный}}} = \frac{n}{K_{\text{dis}}} - \frac{[\text{ЦД}]_{\text{связанный}}}{K_{\text{dis}}},$$

где параметр  $n$  указывает на количество независимых сайтов связывания. Значение  $K_{\text{dis}}$  рассчитывалось при построении графика в координатах  $[\text{ЦД}]_{\text{связанный}}/[\text{ЦД}]_{\text{свободный}}$  от  $[\text{ЦД}]_{\text{связанный}}$ .

*Спектры ЯМР<sup>1</sup>H и NOESY* регистрировали в D<sub>2</sub>O (Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (D, 99.9%)) на приборе Bruker Avance 400 (рабочая частота

400 МГц) с 5 мм QNP-датчиком при 299 К. В качестве внутреннего стандарта в спектрах использовали сигнал тяжелой воды ( $\delta\text{H}$  4.75 м.д.). Спектры NOESY регистрировали с использованием стандартной последовательности импульсов  $\text{poesy}$  и временем смещения (спин-лока) 600 мс.

*Спектры эмиссии флуоресценции* регистрировали на флуоресцентном спектрометре Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, США) при длине волны возбуждения 289 нм в интервале от 290 нм до 550 нм.

*Определение констант Штерна–Фольмера:* тушение флуоресценции белка малыми молекулами описано с помощью уравнения Штерна–Фольмера (1), которое учитывает вклад как статистического, так и динамического тушения:

$$F_0/F = 1 + K_{\text{SV}}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (1)$$

где  $F_0$  и  $F$  – интенсивности флуоресценции в отсутствии и в присутствии лекарственной формы (тушителя),  $K_{\text{SV}}$  – константа Штерна–Фольмера,  $[Q]$  – молярная концентрация тушителя,  $k_q$  и  $\tau_0$  – бимолекулярные константы скорости тушения и время жизни флуоресценции белка в отсутствие тушителя.

*Определение термодинамических параметров системы альбумин-лекарственная форма:* константа связывания ЧСА с лекарственной формой ( $K_a$ ) и число сайтов связывания ( $n$ ) были определены с помощью уравнения (2) при температуре 298, 302, 306 и 310 К.

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (2)$$

Термодинамические параметры, такие как изменение свободной энергии Гиббса ( $\Delta G$ ), изменение энтальпии ( $\Delta H$ ), изменение энтропии ( $\Delta S$ ), реакции были определены с помощью уравнения Вант–Гоффа:

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

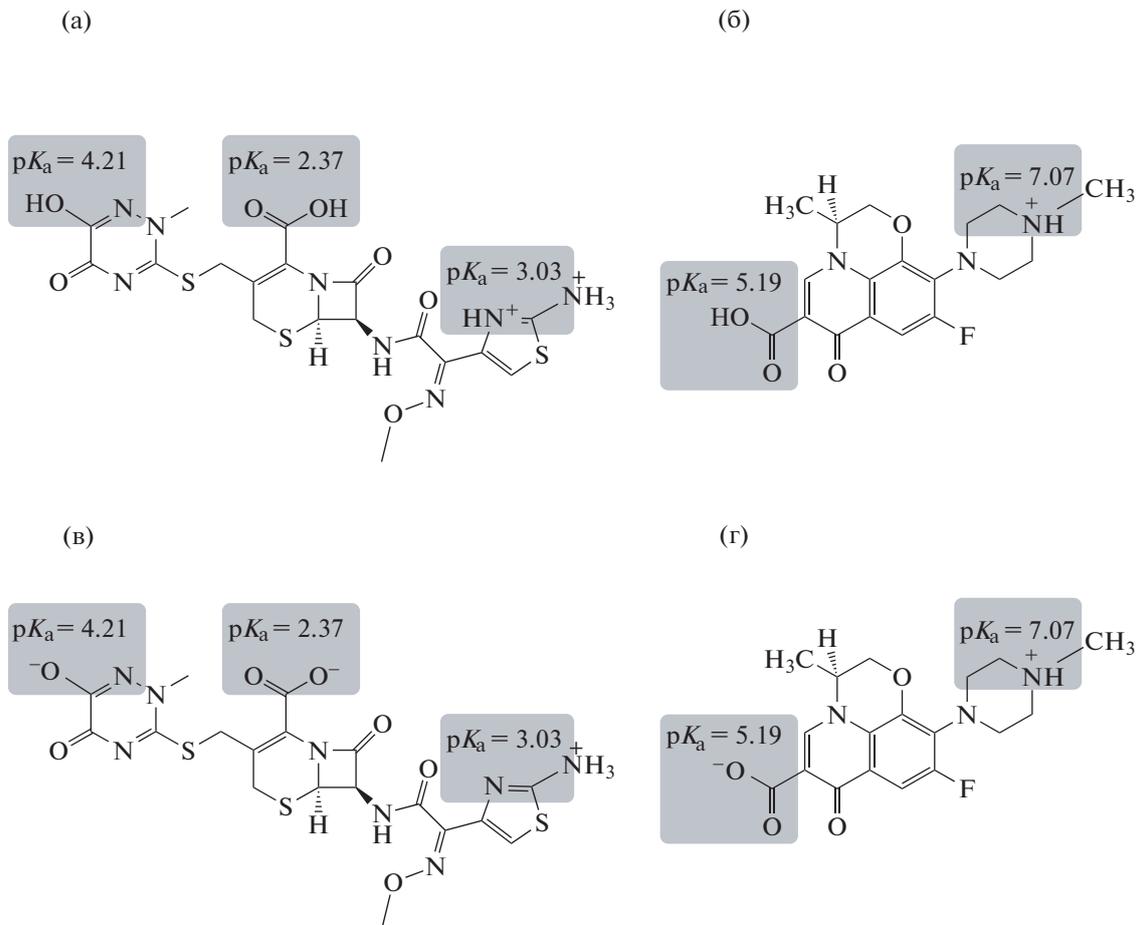
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$$\ln K_a = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT}$$

где  $R$  – универсальная газовая постоянная.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На процесс комплексообразования АМ с ЦД существенно влияет ионное состояние молекулы лекарства. Так, взаимодействие однозарядных молекул с ЦД протекает успешнее, чем многозарядных, в частности цвиттер-ионов [16]. ЦТ и ЛВ содержат в своих структурах несколько ионогенных функциональных групп [15, 17], которые чувствительны к рН раствора (рис. 1), что может обу-



**Рис. 1.** Структурные формулы цефтриаксона (а) (рН 2.0), (б) (рН 7.4) и левофлоксацина (б) (рН 2.0), (г) (рН 7.4) со значениями  $pK_a$  функциональных групп [15, 17].

славливать различные механизмы взаимодействия с ЦД в зависимости от условий среды.

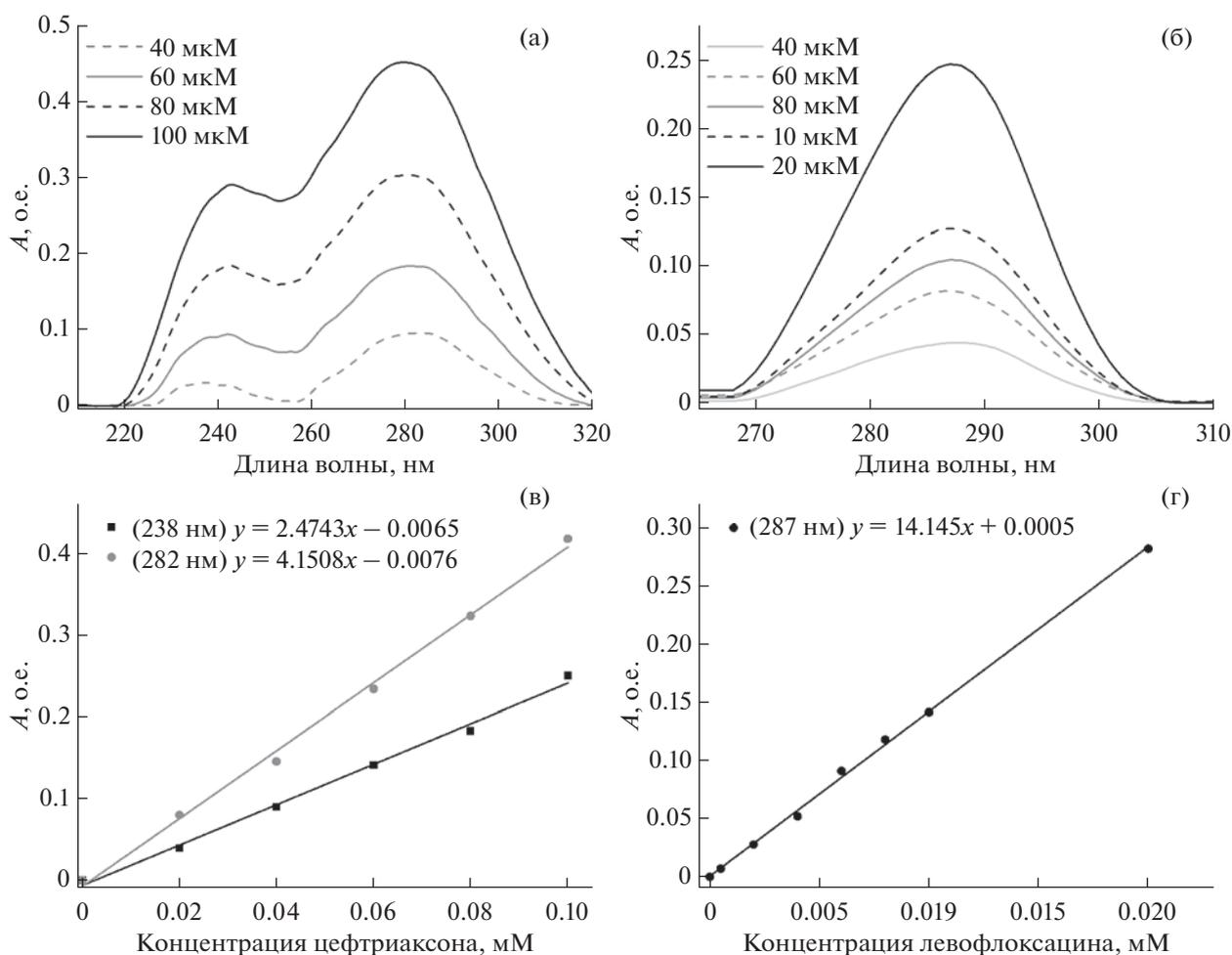
При физиологическом значении рН крови человека (7.4) левофлоксацин существует в виде цвиттер-иона, а цефтриаксон имеет в своей структуре один положительный и два отрицательных заряда, данные ионные формы характеризуются большей полярностью по сравнению с незаряженными молекулами. При рН 2.0, моделирующем кислую среду желудочного сока, АМ переходят в протонированные формы, причем ЛВ находится преимущественно в виде однозарядного катиона, а ЦТ – в виде двухзарядного, в котором положительные заряды находятся на атоме азота пятичленного кольца и аминогруппе (рис. 1)

Также стоит отметить, что по сравнению с ЛВ молекула ЦТ имеет более гидрофильную природу, поскольку содержит в своей структуре большое число электроотрицательных атомов, которые обуславливают полярность связей и всей молекулы в целом. Напротив, архитектура ЛВ представлена по большей части системой конденсированных

колец, которые не вносят вклад в полярность молекулы, что делает ее достаточно гидрофобной.

#### УФ-спектроскопия

Эффективность взаимодействия лекарственных молекул с ГПЦД в данной работе была исследована несколькими методами. Стандартным классическим методом исследования подобных систем является УФ-спектроскопия [18], так как метод характеризуется простотой проведения эксперимента, разнообразием возможных объектов исследования и минимальными расходами реагентов. Растворы индивидуальных веществ ЛВ и ЦТ имеют спектры поглощения в УФ-области, поскольку содержат в своей структуре хромофорные группы: карбонильные атомы и ароматические системы. Максимум полосы поглощения для ЛВ находится при длине волны 287 нм, обусловленный  $\pi-\pi^*$  переходами ароматического остова фторхинолона, УФ-спектр ЦТ характеризуется двумя максимумами интенсивности при 238 и 282 нм (рис. 2). Данные полосы являются аналитически значи-



**Рис. 2.** (а) УФ-спектры цефтриаксона в концентрации 40–100 мкМ. (б) УФ-спектры левофлоксацина в концентрации 4–20 мкМ. (в) Калибровочные зависимости цефтриаксона, полученные при длинах волн 238 и 282 нм. (г) Калибровочная зависимость левофлоксацина, полученная при длине волны 287 нм ( $T = 25^\circ\text{C}$ , pH 7.4, натрий-фосфатный буфер).

мыми для количественного анализа содержания вещества в образце, но не дают детальную информацию о структуре изучаемых соединений.

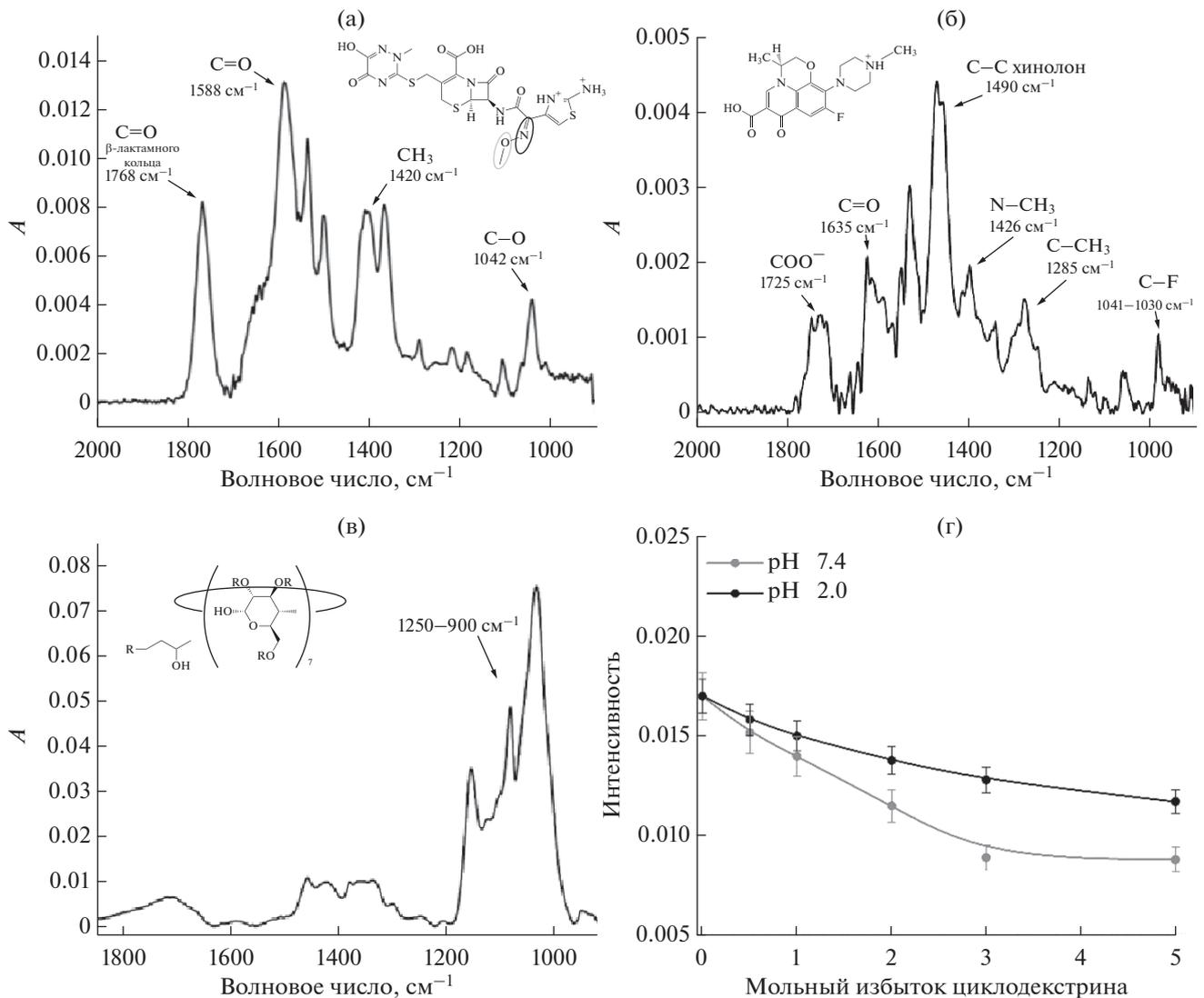
Комплексообразование лекарственных препаратов с ГПЦД приводит к увеличению интенсивности максимумов полос поглощения в спектрах АМ в среднем на 10–15%, что указывает на наличие взаимодействий между ГПЦД и исследуемыми молекулами. Аналогичные изменения в УФ-спектрах отмечены в литературе и другими авторами при исследовании комплексов ЦД-лекарство [18, 19]. Однако предположить молекулярных механизмов комплексообразования и структуры комплексов на основании результатов УФ-спектроскопии не представляется возможным.

#### ИК-спектроскопия

Одним из наиболее информативных методов изучения структуры веществ в растворе является

ИК-спектроскопия Фурье, которая позволяет следить за изменением микроокружения отдельных функциональных групп исследуемой молекулы, и как следствие, дает возможность оценить участие данных фрагментов молекулы во взаимодействии с лигандами.

В ИК-спектре ЦТ наблюдается ряд характеристических полос поглощения, наиболее интенсивными из которых являются:  $1768\text{ см}^{-1}$  (соответствующая валентным колебаниям связей  $\text{C}=\text{O}$   $\beta$ -лактамного кольца),  $1420\text{ см}^{-1}$  (соответствующая деформационным колебаниям  $-\text{CH}_3$  фрагмента метокси группы),  $1042\text{ см}^{-1}$  (соответствующая валентным колебаниям  $\text{C}-\text{O}$  связей метокси группы) и  $1588\text{ см}^{-1}$  (соответствующая валентным колебаниям связи  $\text{C}=\text{N}$  метилоксимной группы) (рис. 3а) [4]. В интенсивность полосы  $1588\text{ см}^{-1}$  вносит вклад колебания связи  $\text{C}=\text{O}$  карбоксильной группы и связи  $\text{C}=\text{N}$  метилоксимной группы,



**Рис. 3.** (а) ИК-спектр цефтриаксона,  $c = 10$  мМ (рН 7.4). (б) ИК-спектр левофлоксацина,  $c = 3$  мМ (рН 7.4). (в) ИК-спектр гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрина,  $c = 34$  мМ (рН 7.4). (г) Изотермы сорбции цефтриаксона с гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрином при рН 2.0 и 7.4 ( $1588\text{ см}^{-1}$ ) ( $T = 25^\circ\text{C}$ , натрий-фосфатный или солянокислый буфер).

однако, вклад последней является существенно более значительным согласно литературным данным [20].

В структуре ЛВ также можно выделить ряд функциональных фрагментов, способных поглощать в ИК-области: ароматическая структура хинолона ( $1490\text{ см}^{-1}$ ), гетероцикл ( $1426\text{ см}^{-1}$ ), карбоксильная ( $1725\text{ см}^{-1}$ ) и карбонильная группы ( $1635\text{ см}^{-1}$ ) (рис. 3б) [19, 21].

В ИК-спектре ГПЦД наиболее аналитически значимыми являются полосы поглощения, которые характеризуются длиной волны  $1250\text{--}900\text{ см}^{-1}$ . Таким образом, методом ИК-спектроскопии могут быть исследованы системы лекарственных молекул с ГПЦД, поскольку не происходит зна-

чительного перекрытия релевантных полос в ИК-спектрах индивидуальных веществ (рис. 3в).

Поскольку при изучении свойств лекарственной молекулы требуется детальное рассмотрение ее свойств в условиях внутренних тканей и органов человеческого организма, для проведения экспериментов были выбраны два значения рН 2.0 и 7.4, которые моделируют физиологические условия в желудке и кровотоке соответственно. Для оценки изменений интенсивности основных полос в ИК-спектрах АМ при взаимодействии с ГПЦД, в эксперименте предварительно регистрировали фоновый раствор ГПЦД с концентрацией, равной концентрации ГПЦД в образце. Установлено, что как в кислых, так и в слабощелочных средах (рН 2.0 и рН 7.4) взаимодействие лекарственных мо-

лекул с ГПЦД приводит к уменьшению интенсивности основных полос поглощения в ИК-спектров препаратов. В случае ЛВ, данное изменение имеет более выраженный характер и относится к области 1550–1440 см<sup>-1</sup>, что отвечает колебаниям ароматического фрагмента хинолона. Такой эффект указывает на вовлечение ароматического остова ЛВ во взаимодействие с ГПЦД, по-видимому, за счет погружения данного фрагмента внутрь полости ГПЦД, что характерно для других комплексов фторхинолонов с ЦД [22, 23].

В случае комплекса ЦТ–ГПЦД наиболее существенные изменения в ИК-спектре ЦТ наблюдаются для полосы поглощения 1588 см<sup>-1</sup>, относящиеся к колебаниям связей С=N метилоксимной группы и С=О (СООН).

Динамика изменений основных максимумов для двух препаратов (изотермы сорбции) говорит о том, что более успешно взаимодействие с ГПЦД протекает в случае с ЛВ (рис. 3г).

Для количественной характеристики процесса комплексообразования были рассчитаны  $K_{dis}$  комплексов при линеаризации полученных кривых в координатах Скэтчарда (табл. 1). Важно отметить, что значения  $K_{dis}$  комплексов лежат в диапазоне 10<sup>-2</sup>–10<sup>-3</sup> М, которые характерны для аналогичных систем [24–26]. Важно отметить, что в координатах Скэтчарда график пересекает ось абсцисс в единице, что указывает на существование одного сайта связывания АМ–ЦД, т.е. комплекс преимущественно образуется в мольном соотношении 1 : 1.

Величины  $K_{dis}$  для систем ЦТ с ГПЦД отражают относительно невысокую стабильность комплексов, что характерно и для других препаратов цефалоспоринового ряда, для которых было изучено взаимодействие с производными ЦД [4, 27]. Возможно, такой эффект связан с высокой растворимостью цефалоспориновых антибиотиков.

При исследовании влияния структуры АМ на эффективность связывания с ГПЦД важно отметить, что в случае ЛВ образуются более прочные комплексы. Такой результат, по-видимому, связан с тем, что ЦД образуют комплексы преимущественно за счет включения “гостя” в свою гидрофобную полость со стороны карбоксильной группы, при этом гетероцикл находится снаружи ЦД [23]. В отличие от ЦТ фторхинолон ЛВ содержит гидрофобный ароматический фрагмент в своей структуре (рис. 1) и обладает меньшей растворимостью, что является более предпочтительным для формирования комплекса типа “гость–хозяин” с ГПЦД.

При сравнении  $K_{dis}$  комплексов ЛВ–ГПЦД (табл. 1) при двух значениях рН наблюдается тенденция уменьшения их стабильности при увеличении числа заряженных групп на лекарственной

**Таблица 1.** Значения  $K_{dis}$  (М) комплексов лекарственных препаратов с ГПЦД в разных средах, 37°C

рН	ЛВ + ГПЦД	ЦТ + ГПЦД
2.0	$(1.0 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(2.2 \pm 0.3) \times 10^{-2}$
7.4	$(2.3 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(3.3 \pm 0.4) \times 10^{-2}$

молекуле [16]. Так, при рН 2.0 (катионная форма ЛВ) величина  $K_{dis}$  в два раза ниже, чем при рН 7.4 (цвиттер-ионная форма ЛВ). Аналогичная тенденция установлена и для ионных форм ЦТ. При этом разница констант диссоциации комплексов ЦТ–ГПЦД в разных рН менее выражена, чем в случае комплексов ЛВ–ГПЦД, что может быть связано с иным механизмом взаимодействия и менее эффективным комплексообразованием для более растворимой молекулы ЦТ.

Таким образом, успешность процесса комплексообразования АМ с ГПЦД сильно зависит от структуры АМ и условий среды. Для однозаряженных форм наблюдается более низкое значение  $K_{dis}$ .

#### *Механизм комплексообразования АМ с ГПЦД*

В случае комплекса ЛВ–ГПЦД методом ИК-спектроскопии было показано, что основным центром связывания ЛВ является ароматический фрагмент лекарственной молекулы. По-видимому, комплекс образуется за счет погружения гидрофобного фрагмента ЛВ внутрь полости ГПЦД, что характерно для других фторхинолонов [19, 22]. Результаты спектроскопии <sup>1</sup>Н ЯМР также подтверждают предложенный механизм взаимодействия ЛВ с ГПЦД (табл. 2). Показано, что комплексообразование ЛВ с ГПЦД приводит к изменениям положений пиков в исходном <sup>1</sup>Н ЯМР спектре ЛВ: сигнал, соответствующий протону в 8 положении ароматического кольца (№ 2 в табл. 2), смещается в область слабых полей на 0.12 м.д. Это может свидетельствовать о взаимодействии данной области молекулы с электронакцепторными группами ГПЦД, которыми можно считать метиленовые группы внутренней полости ЦД. Также наблюдаются изменения для сигналов гетероцикла ЛВ: сигнал протонов N-метиленовой группы смещается в область сильных полей на 0.9 м.д., а также наблюдается уширение сигнала в области 3.2–3.5 м.д., отвечающего протонам метиленовых групп пиперазинового фрагмента. Такие изменения свидетельствуют о взаимодействии данного фрагмента молекулы ЛВ с электрондонорными группами (гидроксильными группами) ГПЦД. Таким образом, можно говорить о комплексообразовании комплекса ЛВ–ГПЦД посредством погружения ароматического остова ЛВ в гидрофобную полость ЦД, и его стабилизации за счет взаимодействия пиперазинового фрагмента АМ с внешней

Таблица 2. Химические сдвиги протонов в  $^1\text{H}$  ЯМР спектрах АМ, ЦД и комплексов АМ–ЦД, м.д.  $\text{D}_2\text{O}$ , 400 МГц

№ протона	химический сдвиг, м.д., (мультиплетность)		№ протона	химический сдвиг, м.д., (мультиплетность)	
	ЛВ	ЛВ в комплексе ЛВ–ГПЦД		ЦТ	ЦТ в комплексе ЦТ–ГПЦД
1	8.32 (с)	8.32 (с)	1	7.00 (с)	7.00 (с)
2	7.30 (д)	7.42 (д)	2	5.77 (д)	5.78 (д)
3	3.48 (д)	3.48 (д)	3	5.18 (д)	5.21 (д)
4	2.91 (с)	2.82 (с)	4	3.97 (с)	3.97 (с)
5	1.41 (д)	1.41 (д)	5	3.61 (с)	3.62 (с)

(с) – синглет, (д) – дублет.

полостью ЦД, по-видимому, за счет образования водородных связей, что согласуется с данными молекулярного моделирования аналогичных взаимодействий [28].

Для комплекса ЦТ–ГПЦД важно отметить, что в ИК-спектре активной молекулы обнаруживается не только изменение интенсивности полосы поглощения валентных колебаний  $\text{C}=\text{N}$  метилоксимной группы и  $\text{C}=\text{O}$  ( $\text{COOH}$ )  $1588\text{ см}^{-1}$ , но и явные изменения ее формы (рис. 4). Дополнительные спектральные исследования этих изменений могут раскрыть неизвестные ранее детали взаимодействия ЦТ с ГПЦД.

При деконволюции данной полосы в ИК-спектре ЦТ (рис. 4а) обнаружены две мажорные ( $1650$  и  $1585\text{ см}^{-1}$ ) и две минорные ( $1534$  и  $1500\text{ см}^{-1}$ ) компоненты. Для комплекса ЦТ–ГПЦД наблюдается перераспределение интегральных долей основных компонент (рис. 4б): увеличение доли компоненты  $1650\text{ см}^{-1}$  за счет уменьшения доли компоненты  $1585\text{ см}^{-1}$ . При этом перераспределение долей происходит резко (рис. 4в), уже при мольном избытке ГПЦД равном  $0.25$ , что указывает на значительное изменение микроокружения  $\text{C}=\text{N}$  и  $\text{C}=\text{O}$  ( $\text{COOH}$ ) групп в присутствии ГПЦД в процессе комплексообразования.

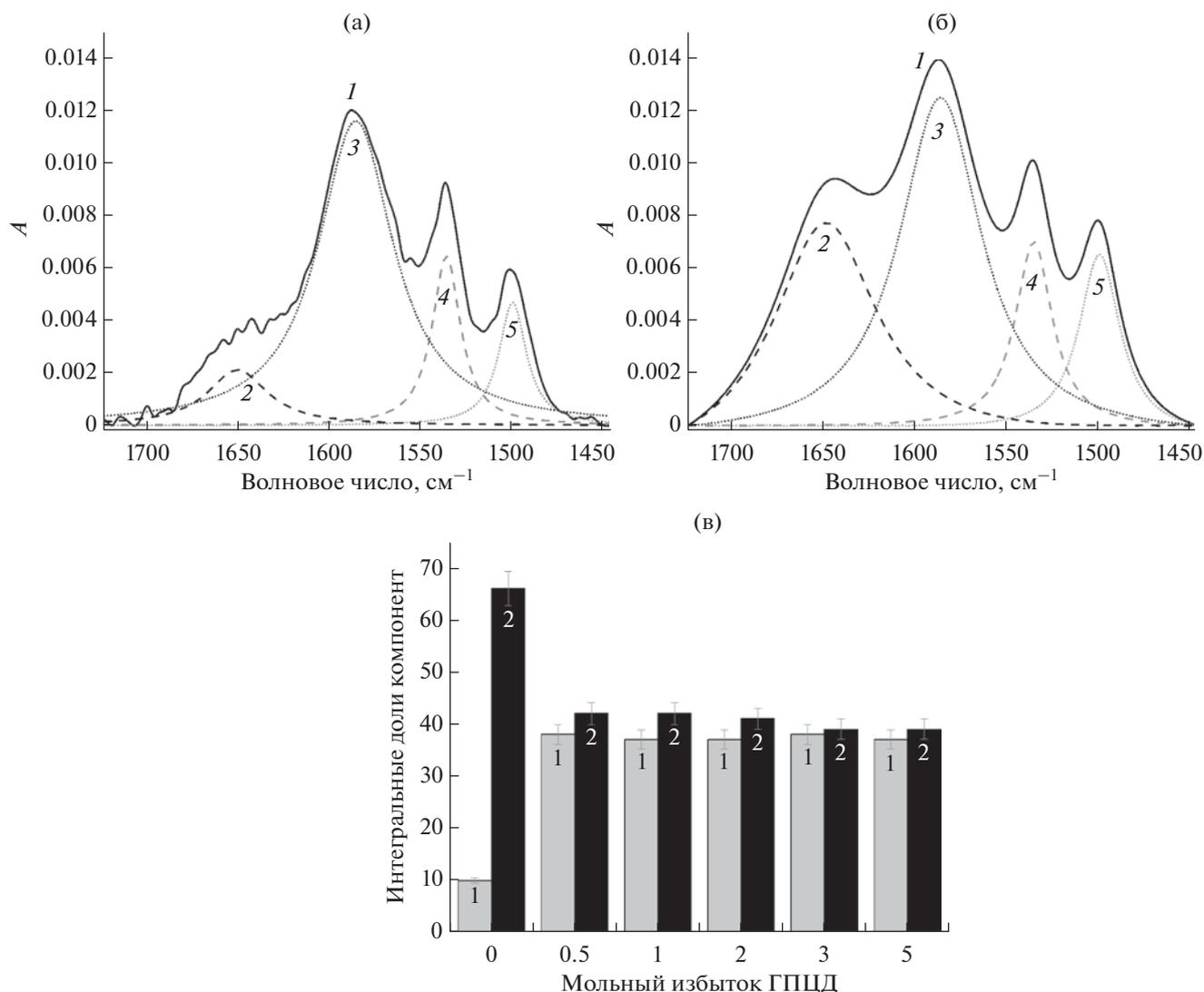
Анализ данных позволяет предположить, что изменение микроокружения  $\text{C}=\text{N}$  и  $\text{C}=\text{O}$  ( $\text{COOH}$ ) групп связан с образованием водородных связей с ГПЦД. Для подтверждения этой гипотезы был проведен независимый эксперимент по опреде-

лению влияния кислотности среды на форму полосы поглощения  $1588\text{ см}^{-1}$  (рис. 5). Обнаружено, что при  $\text{pH}$  2.0 плечо при  $1650\text{ см}^{-1}$  проявляется значительно ярче, чем при  $\text{pH}$  7.4. Таким образом, компонента  $1650\text{ см}^{-1}$  соответствует протонированному состоянию ЦТ. Мы предполагаем, что образование комплекса ЦТ–ГПЦД, по-видимому, происходит за счет образования водородных связей между  $\text{C}=\text{N}$  и  $\text{C}=\text{O}$  ( $\text{COOH}$ ) групп ЦТ и гидроксильными группами ГПЦД.

Данные спектроскопии  $^1\text{H}$  ЯМР для комплекса ЦТ–ГПЦД не позволяют сделать достоверное заключение о механизме взаимодействия, поскольку в спектрах  $^1\text{H}$  происходит перекрывание основных сигналов ЦТ и ГПЦД, что препятствует возможности зафиксировать какие-либо изменения (табл. 2). Поэтому для данного комплекса был получен двумерный спектр (рис. 6).

В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  NOESY протоны Н1 ЦД ( $5.23$  и  $5.06$  м.д.) имеют кросс-пики с протонами метильной группы триазин-диона ( $3.62$  м.д.) и метиленовыми группами ЦТ. Также протоны метильной группы заместителя в ЦД ( $1.141$  м.д.) имеют кросс-пики с протонами оксимного метила ЦТ ( $3.97$  м.д.). По данным ЯМР спектроскопии ЦТ взаимодействует с протонами Н1 и  $-\text{CH}_3$  заместителя ЦД. По-видимому, ЦТ не погружается в полость ЦД, а располагается вблизи тора ЦД, что подтверждает данные ИК-спектроскопии.

Для терапии тяжелых форм пневмонии, вызванной перенесенным заболеванием вируса



**Рис. 4.** Деконволюция полосы поглощения  $1588\text{ см}^{-1}$  в ИК-спектре цефтриаксона (а) и комплекса цефтриаксон-ГПЦД (б) (мольное соотношение 1 : 0.25),  $c = 34\text{ мМ}$ ,  $\text{pH} 7.4$ . Исходный спектр цефтриаксона до деконволюции (1), мажорные компоненты  $1650$  (2) и  $1585\text{ см}^{-1}$  (3), минорные компоненты  $1534$  (4) и  $1500\text{ см}^{-1}$  (5). (в) Зависимость интегральных долей мажорных компонент  $1650$  (1) и  $1585\text{ см}^{-1}$  (2) в зависимости от мольного избытка ГПЦД в комплексе ЦТ-ГПЦД ( $T = 25^\circ\text{C}$ , натрий-фосфатный буфер).

COVID-19, используется внутривенное введение ЦТ и ЛВ. По этой причине актуальной задачей является не только изучение взаимодействия АМ-ЦД, но и исследование влияния ЦД на связывание АМ с белками плазмы крови, в частности ЧСА. Поскольку ЧСА функционирует при физиологическом значении  $\text{pH}$  необходимо исследовать взаимодействие альбумин – лекарственная форма в нейтральных условиях.

*Исследование влияния комплексообразования препаратов с ЦД на эффективность их взаимодействие с ЧСА*

Изучение взаимодействие комплексов АМ-ЦД с ЧСА осуществлялось методом флуоресцентной

спектроскопии, которая широко используется для исследования биологических систем, поскольку характеризуется высокой чувствительностью и позволяет анализировать несколько веществ в одной системе [29].

Основной вклад в флуоресценцию ЧСА вносят остатки аминокислот: триптофана (Trp), тирозина (Tyr) и фенилаланина (Phe). При этом остаток Trp вносит наибольший вклад в эмиссию флуоресценции белка [30]. При длине волны возбуждения  $280\text{ нм}$  максимум спектра эмиссии ЧСА наблюдается при  $345\text{ нм}$ . Данная полоса является чувствительной к взаимодействию белка с лекарственными препаратами [15].

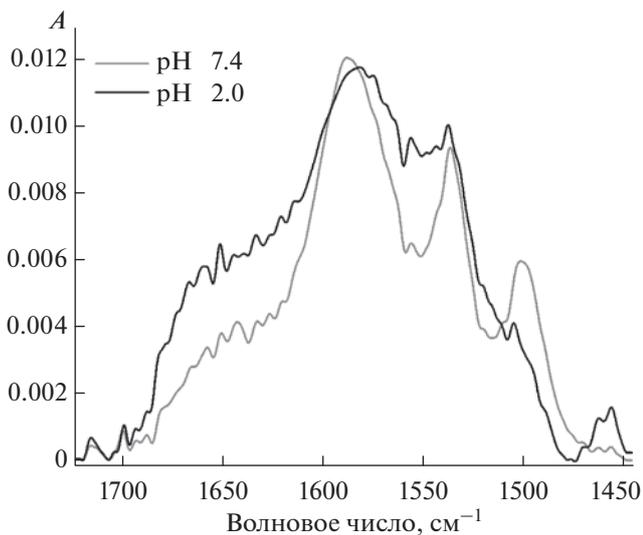


Рис. 5. ИК-спектры цефтриаксона при pH 7.4 и 2.0 ( $c = 7.5$  мМ) ( $T = 25^\circ\text{C}$ , натрий-фосфатный или солянокислый буфер).

В аналогичных условиях в спектре эмиссии ЛВ присутствует пик с максимумом 456 нм, что свидетельствует о том, что при pH 7.4 ЛВ находится в цвиттер-ионной форме [31]. Вторая исследуемая лекарственная молекула ЦТ не имеет флуоресценции при  $\lambda_{\text{возб}}$  280 нм. Таким образом, спектры эмиссии препаратов не перекрываются со спектром эмиссии ЧСА, позволяет беспрепятственно следить за состоянием альбумина.

Взаимодействие лекарственных молекул с белком может способствовать усилению или ослаблению (тушению) интенсивности излучения альбумина. Снижение интенсивности, как правило, обусловлено статистическим и/или динамическим тушением, молекулярными перегруппировками, процессами переноса энергии и т.д. [32].

Установлено, что постепенное увеличение концентрации ЛВ и ЦТ в присутствии ЧСА приводит к уменьшению флуоресценции белка, что свидетельствует об изменении микроокружения Trp214 и комплексообразовании между АМ и альбумином. Аналогичные тенденции наблюдаются и для трехкомпонентных систем АМ–ГПЦД–белок. Стоит отметить, что при взаимодействии ЧСА с ЛВ и комплекса с ЛВ–ГПЦД положение максимума эмиссии белка смещается в длинноволновую область на  $\sim 10$  нм. Это может свидетельствовать о том, что остаток Trp214 оказывается в менее гидрофобном окружении [33, 34]. Таким образом, при взаимодействии ЧСА с ЛВ и его комплексом с ГПЦД происходят изменения в структуре белка. Поскольку в случае ЦТ и ЦТ–ГПЦД не происходит аналогичных изменений в спектре белка, можно предположить, что более гидрофобная молекула ЛВ взаимодействует с ЧСА сильнее, чем ЦТ.

Тушение флуоресценции белка малыми молекулами может иметь статистическую и/или динамическую природу. Как статистическое, так и динамическое тушение могут быть описаны с помощью уравнения Штерна–Фольмера (1), однако только в случае статистического тушения оно может быть преобразовано в уравнение (2). Для выяснения механизма тушения флуоресценции (и расчета термодинамических параметров систем) данные тушения эмиссии флуоресценции ЧСА, полученные при разных температурах, были проанализированы в координатах Штерна–Фольмера (рис. 7).

Важно отметить, что для всех типов рассматриваемых лекарственных форм (АМ и АМ–ГПЦД) наблюдается положительное отклонение от линейной зависимости при высоких концентрациях АМ. Такой эффект свидетельствует о том, что тушение флуоресценции вызвано несколькими механизмами при высоких мольных избытках препаратов относительно альбумина (рис. 7б) [35, 36]. Для выяснения наиболее вероятного механизма, который вызывает тушение флуоресценции белка, анализировался начальный участок зависимости, из которого были рассчитаны значения  $K_{SV}$  при различных температурах (табл. 3). Температурный диапазон был подобран таким образом, чтобы в нем не происходило структурной деградации молекул ЧСА [37].

Уменьшение значений  $K_{SV}$  при увеличении температуры дает основания полагать, что механизм тушения флуоресценции при низких концентрациях лекарства носит статистический характер. Еще одним доказательством преобладающего вклада статистического тушения может служить значения констант скорости тушения  $k_q$  (табл. 3), рассчитанные из значений  $K_{SV}$  и  $\tau_0 = 5.71 \times 10^{-9}$  с, которая является постоянной величиной [38] для каждой температуры. Наблюдаемое значение  $k_q$  значительно превышает бимолекулярную константу скорости тушения  $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , что говорит о преобладающем вкладе статистического тушения [33, 37].

#### *Изучение влияния комплексообразования препаратов с ЦД на термодинамические параметры взаимодействия лекарств с ЧСА*

Поскольку при низких концентрациях АМ тушение флуоресценции имеет статистическую природу, уравнение (1) может быть преобразовано в уравнение (2), с помощью которого были определены константы связывания ( $K_a$ ) и стехиометрических коэффициентов ( $n$ ). Для всех систем АМ–ЧСА было показано уменьшение  $K_a$  и  $n$  с увеличением температуры (табл. 4). Для более детального понимания влияния комплексообразования антибактериальных препаратов с ГПЦД на взаимодействие с ЧСА были рассчитаны термодинамические параметры данной реакции.

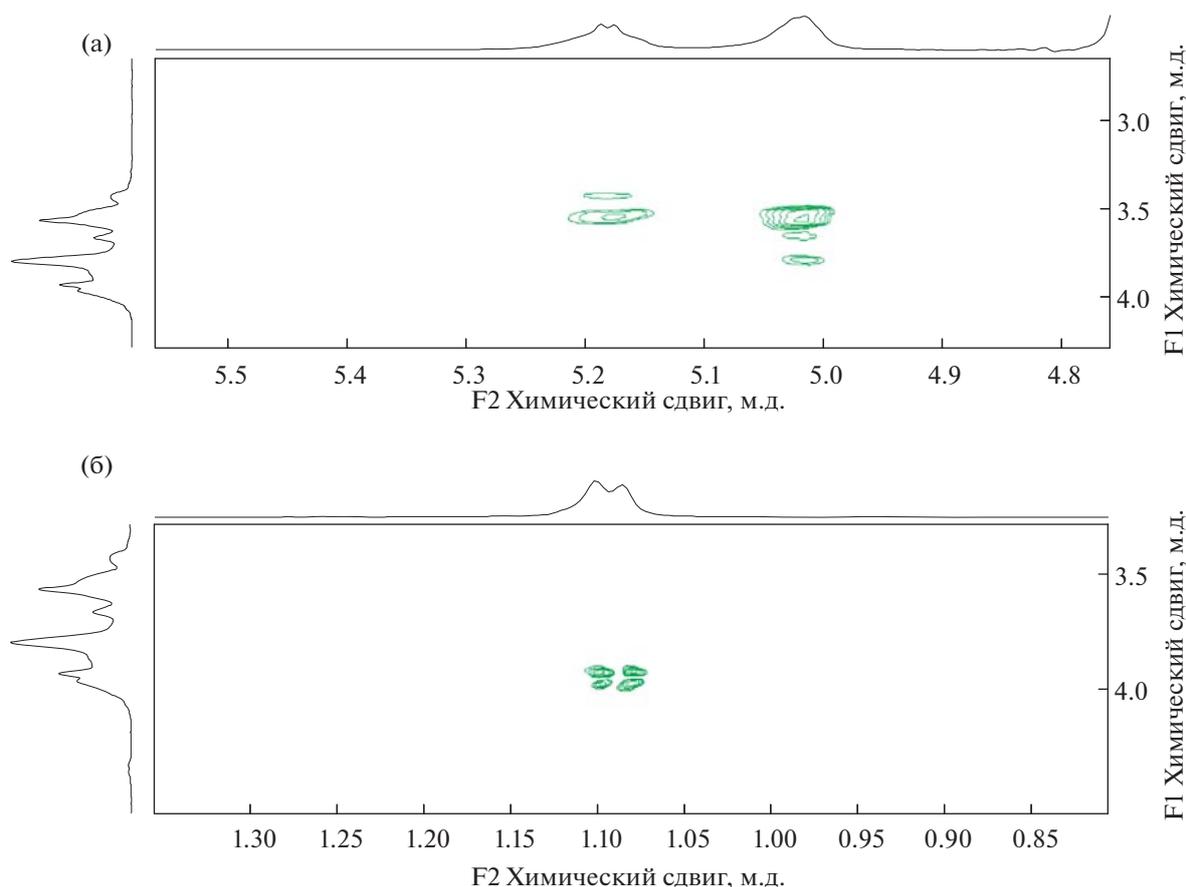


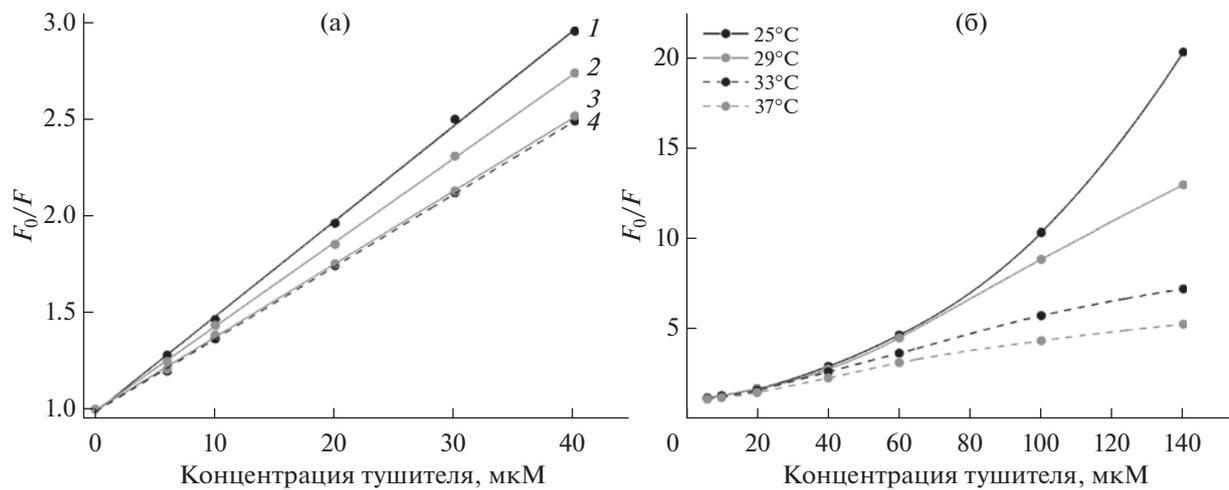
Рис. 6. Фрагменты спектра ЯМР  $^1\text{H}$  NOESY комплекса ЦТ-ЦД, D $_2\text{O}$ , 400 МГц.

Основными силами, участвующими в процессе комплексообразования, могут быть образование водородных связей, электростатические, гидрофобные и вандерваальсовы взаимодействия [38, 39]. Данные взаимодействия вносят положительный или отрицательный вклад в  $\Delta H$  и  $\Delta S$  в соответствие с таблицей 5 [39].

Считая, что в температурном диапазоне от 298 К до 310 К зависимость  $\Delta H$  и  $\Delta S$  от температуры пренебрежимо мала, с помощью уравнений (3)–(5) были рассчитаны  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  и  $\Delta G$  реакции комплексообразования (табл. 4). Было показано, что комплексообразование АМ с ЧСА протекает самопроизвольно в исследуемом температурном интервале. Отрицательные значения  $\Delta H$  и  $\Delta S$  позволяют предположить, что комплексообразование протекает преимущественно за счет сил Ван-дер-Ваальса и образования водородных связей. Стоит отметить, что  $\Delta H$  и  $\Delta S$  для комплекса ЦТ + ЧСА значительно меньше (в  $\sim 3.2$  и  $\sim 7.2$  раз соответственно), чем для ЛВ + ЧСА, что, по всей видимости, свидетельствует о различном механизме взаимодействия альбумина с этими лекарствами. Связывание лекарственных молекул с ЧСА происходит в основном в субдоменах ПА (сайт I) и ПИА (сайт II) [14]. При

этом гидрофобная полость в сайте II меньше, чем в сайте I [40]. В литературе показано, что в отличие от ЛВ, который одинаково прочно связывается в субдомене ПА и ПИА [41], ЦТ, будучи довольно крупной молекулой, связывается в сайте II значительно менее прочно, чем в сайте I [42, 43].

Значительное уменьшение значений  $\Delta H$  и  $\Delta S$  (в  $\sim 3.6$  и  $\sim 8.6$  раз соответственно) при связывании ЛВ в комплекс с ГПЦД вероятно обусловлено увеличением числа водородных связей, образующихся при взаимодействии гидроксильных групп ГПЦД с молекулой альбумина. Стоит отметить, что для системы ЧСА + (ЛВ–ГПЦД) наблюдается значительное уменьшение константы связывания при увеличении температуры (в  $\sim 30$  раз), чего не происходило в системе ЧСА + ЛВ. Такой эффект может свидетельствовать об изменении механизма взаимодействия между ЧСА и ЛВ при комплексообразовании ЛВ–ГПЦД. По всей видимости, ЛВ–ГПЦД, имеющий значительно больший размер, чем свободный ЛВ, при увеличении скорости движения молекул не может полностью проникнуть в гидрофобные карманы ЧСА и взаимодействует преимущественно с гидрофильными группами на поверхности альбумина.



**Рис. 7.** (а) Зависимости Штерна–Фольмера, выражающие эффект тушения человеческого сывороточного альбумина  $F_0/F$  (345 нм) от концентрации левофлоксацина (1), цефтриаксона (3) и комплекса левофлоксацина (2) и цефтриаксона (4) с гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрином (соотношение 1 : 1) при 33°C. (б) Зависимости Штерна–Фольмера, выражающие эффект тушения человеческого сывороточного альбумина  $F_0/F$  (345 нм) от температуры для комплексов левофлоксацина с гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрином (соотношение 1 : 1) (натрий-фосфатный буфер).

Стоит отметить, что для систем ЧСА + ЦТ и ЧСА + (ЦТ–ГПЦД) значения  $K_a$ ,  $n$  и другие термодинамические параметры практически совпадают. По всей видимости, при связывании с альбумином комплекс ЦТ–ГПЦД разрушается, и ЦТ взаимодействует с белком в свободном виде. Таким образом, наибольшее влияние на связывание с белком ГПЦД будет оказывать для лекарствен-

ных гидрофобных лекарственных препаратов, характеризующихся  $K_{dis}$  не менее  $10^{-3}$  М.

## ВЫВОДЫ

В работе исследованы комплексы ГПЦД с двумя лекарственными препаратами ЛВ и ЦТ, которые используются для лечения бактериальных респираторных заболеваний.

**Таблица 3.** Температурная зависимость констант тушения Штерна–Фольмера для систем ЧСА + АМ и ЧСА + АМ–ГПЦД

	Температура, К	$K_{SV} \times 10^{-3}, M^{-1}$	$k_q \times 10^{-12}, M^{-1} c^{-1}$
ЧСА + ЛВ	298	$75 \pm 6$	$13 \pm 1$
	302	$58 \pm 4$	$10.5 \pm 0.7$
	306	$49 \pm 2$	$8.6 \pm 0.4$
	310	$34 \pm 2$	$5.9 \pm 0.3$
ЧСА + (ЛВ–ГПЦД)	298	$58 \pm 5$	$10.1 \pm 0.9$
	302	$49 \pm 4$	$8.6 \pm 0.8$
	306	$41 \pm 3$	$7.3 \pm 0.6$
	310	$33 \pm 3$	$5.8 \pm 0.5$
ЧСА + ЦТ	298	$59 \pm 5$	$10.8 \pm 0.9$
	302	$50 \pm 2$	$8.9 \pm 0.5$
	306	$37.5 \pm 0.8$	$6.6 \pm 0.2$
	310	$24.2 \pm 0.8$	$4.29 \pm 0.14$
ЧСА + (ЦТ–ГПЦД)	298	$58 \pm 5$	$10.1 \pm 0.9$
	302	$51 \pm 2$	$8.9 \pm 0.4$
	306	$37.3 \pm 0.8$	$6.52 \pm 0.14$
	310	$24.3 \pm 0.8$	$4.25 \pm 0.14$

Таблица 4. Термодинамические параметры взаимодействия ЧСА с АМ и АМ–ГПЦД

	Температура, К	$n$	$K_a \times 10^{-5}, M^{-1}$	$\Delta G$ , кДж/моль	$\Delta H$ , кДж/моль	$\Delta S$ , Дж/моль/К
ЧСА + ЛВ	298	$1.34 \pm 0.07$	$23.4 \pm 0.5$	$-36.30 \pm 0.06$	$-57.7 \pm 0.8$	$-71.3 \pm 2.4$
	302	$1.33 \pm 0.02$	$17.9 \pm 0.3$	$-36.14 \pm 0.06$		
	306	$1.32 \pm 0.03$	$13.1 \pm 0.4$	$-35.84 \pm 0.06$		
	310	$1.33 \pm 0.05$	$9.9 \pm 0.2$	$-35.57 \pm 0.05$		
ЧСА + (ЛВ–ГПЦД)	298	$1.51 \pm 0.08$	$110 \pm 1.2$	$-40.01 \pm 0.02$	$-217.6 \pm 0.9$	$-596 \pm 4$
	302	$1.41 \pm 0.04$	$34 \pm 0.5$	$-37.7 \pm 0.04$		
	306	$1.33 \pm 0.03$	$12.6 \pm 0.2$	$-35.7 \pm 0.04$		
	310	$1.24 \pm 0.03$	$3.5 \pm 0.5$	$-32.9 \pm 0.03$		
ЧСА + ЦТ	298	$1.42 \pm 0.03$	$50.6 \pm 0.5$	$-38.28 \pm 0.17$	$-193.5 \pm 0.8$	$-520 \pm 2$
	302	$1.39 \pm 0.02$	$15.5 \pm 0.3$	$-35.82 \pm 0.04$		
	306	$1.32 \pm 0.03$	$5.0 \pm 0.1$	$-34.03 \pm 0.07$		
	310	$1.23 \pm 0.03$	$2.30 \pm 0.03$	$-31.75 \pm 0.15$		
ЧСА + (ЦТ–ГПЦД)	298	$1.45 \pm 0.03$	$50.1 \pm 0.5$	$-38.23 \pm 0.17$	$-193.3 \pm 0.8$	$-521 \pm 2$
	302	$1.38 \pm 0.02$	$15.8 \pm 0.3$	$-35.84 \pm 0.04$		
	306	$1.31 \pm 0.03$	$4.9 \pm 0.1$	$-34.09 \pm 0.07$		
	310	$1.24 \pm 0.03$	$2.33 \pm 0.03$	$-31.85 \pm 0.15$		

Таблица 5. Ожидаемое значение вклада различных типов взаимодействий в  $\Delta H$  и  $\Delta S$  [39]

	$\Delta H$	$\Delta S$
Гидрофобные взаимодействия	Положительное	Положительное
Вандерваальсовы взаимодействия	Отрицательное	Отрицательное
Образование водородных связей в среде с низкой диэлектрической проницаемостью	Отрицательное	Отрицательное
Ионные взаимодействия (нейтрализация заряда)	Незначительное отрицательное или положительное	Положительное
Протонирование	Отрицательное	Отрицательное

торных инфекций, в различных средах, моделирующих физиологические условия. Установлено, что  $K_{dis}$  для АМ–ГПЦД находятся в диапазоне  $10^{-2}$ – $10^{-3}$  М. Наиболее низкие значения  $K_{dis}$  были получены при рН 2.0 для однозарядных форм АМ. Наиболее эффективное комплексообразование характерно для более гидрофобной молекулы ЛВ с ароматическим фрагментом, который погружается в полость ГПЦД. Комплекс ГПЦД с более гидрофильной лекарственной молекулой ЦТ, по-видимому, образуется на поверхности ГПЦД при участии Н1 и метильной группы заместителя олигосахаридов.

Методом флуоресцентной спектроскопии изучен процесс комплексообразования АМ с ЧСА. Показано, что взаимодействие ЧСА с АМ приво-

дит к тушению флуоресценции, которое носит статистический характер при небольших избытках АМ ( $C_{AM}/C_{ЧСА} \leq 3$ ). На основании полученных зависимостей тушения флуоресценции от мольного избытка АМ рассчитаны термодинамические параметры комплексообразования. Установлено, что взаимодействие АМ с ЧСА происходит преимущественно за счет вандерваальсовых взаимодействий и за счет образования водородных связей и характеризуется константами ассоциации порядка  $\sim 10^5$ – $10^6$  при 37°C. Связывание ЛВ в комплекс с ГПЦД приводит к уменьшению константы в  $\sim 3$  раза. При этом образование трехкомпонентных систем, содержащих ЦТ, никак не сказывалось на  $K_a$  и других термодинамических параметров. Таким образом, добиться изменения во взаимодей-

ствии лекарственных систем с ЧСА можно лишь при условии, что они характеризуются  $K_{\text{dis}}$  не менее  $10^{-3}$  М.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена с использованием ИК-Фурье спектрометра Tensor 27 Bruker и спектрометра кругового дихроизма Jasco J-815 при поддержке программы развития МГУ. Источник финансирования: стипендия Президента РФ молодым ученым и аспирантам 2022–2024.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеев С.Н., Белобородов В.Б., Омеляновский В.В. и др. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), 2020. V. 9 26.10.2.
2. Чамсутдинов Н.У., Абдулманапова Д.Н. Тактика лечения пациентов новой коронавирусной инфекцией (COVID-19): Нерешенные проблемы пульмонологии // Вестник ДГМА. 2021. V. 3. № 40. P. 42–54.
3. Van Bambeke F., Michot J.M., Van Eldere J. et al. Quinolones in 2005: An Update // Clinical Microbiology and Infection. 2005. V. 11. № 4. P. 256–280.
4. Owens H.M., Dash A.K. Ceftriaxone sodium: comprehensive profile // Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. 2003. V. 30. № 03. P. 21–57.
5. Davis M.E., Brewster M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future // Nature Reviews Drug Discovery. 2004. V. 3. № 12. P. 1023–1035.
6. Raut S.Y., Manne A.S.N., Kalthur G. et al. Cyclodextrins as carriers in targeted delivery of therapeutic agents: focused review on traditional and inimitable applications // Current Pharmaceutical Design. 2019. V. 25. № 4. P. 444–454.
7. Loftsson T., Jarho P., Másson M., et al. Cyclodextrins in drug delivery // Expert Opinion on Drug Delivery. 2005. V. 2. № 2. P. 335–351.
8. Stella V.J., He Q. Cyclodextrins // Toxicologic Pathology. 2008. V. 36. № 1. P. 30–42.
9. Trindade T.M., Salgado H.R.N. A Critical review of analytical methods for determination of ceftriaxone sodium // Critical Reviews in Analytical Chemistry. 2018. V. 48. № 2. P. 95–101.
10. Talley J.H. Fluoroquinolones // Postgraduate Medicine. 1991. V. 89. № 1. P. 101–113.
11. Davis R., Bryson H.M. Levofloxacin // Drugs. 1994. V. 47. № 4. P. 677–700.
12. Yang F., Zhang Y., Liang H. Interactive association of drugs binding to human serum albumin // International Journal of Molecular Sciences. 2014. V. 15. № 3. P. 3580–3595.
13. Fanali G., di Masi A., Trezza V., et al. Human serum albumin: from bench to bedside // Molecular Aspects of Medicine. 2012. V. 33. № 3. P. 209–290.
14. Varshney A., SEN P., Ahmad E., et al. Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? // Chirality. 2010. V. 22. № March 2010. P. 77–87.
15. Yakupova L.R., Kopnova T.Y., Skuredina A.A. et al. Effect of methyl- $\beta$ -cyclodextrin on the interaction of fluoroquinolones with human serum albumin // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2022. V. 48. № 1. P. 163–172.
16. Loftsson T., Petersen D.S. Cyclodextrin solubilization of ETH-615, a zwitterionic drug // Drug Development and Industrial Pharmacy. 1998. V. 24. № 4. P. 365–370.
17. Aleksić M., Savić V., Popović G., et al. Acidity Constants of cefetamet, cefotaxime and ceftriaxone; the effect of the substituent at C3 position // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2005. V. 39. № 3–4. P. 752–756.
18. Crupi V., Ficarra R., Guardo M. et al. UV-Vis and FTIR-ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complexes of genistein with  $\beta$ -cyclodextrins // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007. V. 44. № 1. P. 110–117.
19. Misiuk W., Jozefowicz M. Study on a host–guest interaction of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin with ofloxacin // Journal of Molecular Liquids. 2015. V. 202. P. 101–106.
20. Manimekalai P., Dhanalakshmi R., Manavalan R. Preparation and characterization of ceftriaxone sodium encapsulated chitosan nanoparticles // International Journal of Applied Pharmaceutics. 2017. V. 9. № 6. P. 10.
21. Gunasekaran S., Rajalakshmi K., Kumaresan S. Vibrational analysis, electronic structure and nonlinear optical properties of levofloxacin by density functional theory // Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2013. V. 112. P. 351–363.
22. Skuredina A.A., Kopnova T.Y., Le-deygen I.M. et al. Physical and chemical properties of the guest–host inclusion complexes of ciprofloxacin with  $\beta$ -cyclodextrin derivatives // Moscow University Chemistry Bulletin. 2020. V. 75. № 4. P. 218–224.
23. Skuredina A.A., Le-Deygen I.M., Kudryashova E.V. The effect of molecular architecture of sulfobutyl ether  $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles on physicochemical properties of complexes with moxifloxacin // Colloid Journal. 2018. V. 80. № 3. P. 312–319.
24. Jagdale S.C., Mohanty P., Chabukswar A.R. et al. Dissolution rate enhancement, design and development of buccal drug delivery of darifenacin hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes // Journal of Pharmaceutics. 2013. V. 2013. P. 1–11.
25. Ferrazza R., Rossi B., Guella G. DOSY-NMR and Raman investigations on the self-aggregation and cyclodextrin complexation of vanillin // Journal of Physical Chemistry B. 2014. V. 118. № 25. P. 7147–7155.
26. Upadhyay S.K., Kumar G. NMR and molecular modeling studies on the interaction of fluconazole with  $\beta$ -cyclodextrin // Chemistry Central Journal. 2009. V. 3. № 1. P. 1–9.
27. Sapté S., Pore Y. Inclusion complexes of cefuroxime axetil with  $\beta$ -cyclodextrin: physicochemical characterization, molecular modeling and effect of L-arginine on

- complexation // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016. V. 6. № 5. P. 300–306.
28. *Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Uporov I.V., et al.* Thermodynamics and molecular insight in guest–host complexes of fluoroquinolones with  $\beta$ -cyclodextrin derivatives, as revealed by ATR-FTIR spectroscopy and molecular modeling experiments // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017. V. 409. № 27. P. 6451–6462.
29. *Valeur B.* Molecular fluorescence // *Encyclopedia of Applied Spectroscopy*. 2009.
30. *Varshney A., Ansari Y., Zaidi N. et al.* Analysis of binding interaction between antibacterial ciprofloxacin and human serum albumin by spectroscopic Techniques // *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2014. V. 70. № 1. P. 93–101.
31. *Nazar M.F., Azeem W., Rana U.A. et al.* Ph-dependent probing of levofloxacin assimilated in surfactant mediated assemblies: insights from photoluminescent and chromatographic measurements // *Journal of Molecular Liquids*. 2016. V. 220. P. 26–32.
32. *Paul B.K., Guchhait N.* A spectral deciphering of the binding interaction of an intramolecular charge transfer fluorescence probe with a cationic protein: thermodynamic analysis of the binding phenomenon combined with blind docking study // *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2011. V. 10. № 6. P. 980–991.
33. *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 // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018. V. 191. P. 259–270.
34. *Кудряшова Е.В., Гладиллин А.К., Левашов А.В.* Белки в надмолекулярных ансамблях: исследование структуры методом разрешенно-временной флуоресцентной анизотропии // *Успехи биологической химии*. 2002. V. 42. P. 257–294.
35. *Yang Y., Hu Q., Fan Y. et al.* Study on the binding of luteolin to bovine serum albumin // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2008. V. 69. № 2. P. 432–436.
36. *Patel S., Datta A.* Steady state and time-resolved fluorescence investigation of the specific binding of two chlorin derivatives with human serum albumin // *Journal of Physical Chemistry B*. 2007. V. 111. № 35. P. 10557–10562.
37. *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 // *Analytica Chimica Acta*. 2007. V. 603. № 1. P. 101–110.
38. *Rehman M.T., Shamsi H., Khan A.U.* Insight into the binding mechanism of imipenem to human serum albumin by spectroscopic and computational approaches // *Molecular Pharmaceutics*. 2014. V. 11. № 6. P. 1785–1797.
39. *Ross P.D., Subramanian S.* Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability // *Biochemistry*. 1981. V. 20. № 11. P. 3096–3102.
40. *Ghuman J., Zunszain P.A., Petitpas I. et al.* Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin // *Journal of Molecular Biology*. 2005. V. 353. № 1. P. 38–52.
41. *Seedher N., Agarwal P.* Complexation of fluoroquinolone antibiotics with human serum albumin: a fluorescence quenching study // *Journal of Luminescence*. 2010. V. 130. № 10. P. 1841–1848.
42. *Ermakova E.A., Danilova A.G., Khairutdinov B.I.* Interaction of ceftriaxone and rutin with human serum albumin. WaterLOGSY-NMR and molecular docking study // *Journal of Molecular Structure*. 2020. V. 1203. P. 127444.
43. *Abu T.M.M., Ghithan J., Abu-Taha M.I. et al.* Spectroscopic approach of the interaction study of ceftriaxone and human serum albumin // *Journal of Biophysics and Structural Biology*. 2014. V. 6. № 1. P. 1–12.