**INSTITUTE OF APPLIED MECHANICS, RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES,
MOSCOW, RUSSIA**

UDC 579. 872: 579 222.2

BBC 28.072

Microbiology: Biochemistry and Physiology of Microorganisms
03 - Life Sciences**BIOCONVERSIONS OF POTENTIALLY ANTI-TUMOR FLUOROQUINOLONES****Ph.D. I. A. Parshikov****Sc.D. E. I. Zarsky**

Abstract. Enrofloxacin and ofloxacin are active antibacterial agents and are used in veterinary medicine and medicine. Recently, it became known about the antitumor properties of fluoroquinolones. Were studied bioconversions of enrofloxacin and ofloxacin by the fungus *Rhizoctonia solani*. High-performance liquid chromatography (HPLC) showed that in a liquid medium the fungus transformed each substance into only one metabolite. Both metabolites were identified based on mass spectra and ¹H NMR spectra. The product from enrofloxacin (yield 14.4 % of the total peak area at 280 nm) was identified as enrofloxacin *N*-oxide. The product from ofloxacin (yield 40.0 % of the total peak area at 280 nm) was identified as ofloxacin *N*-oxide. Thus, when the transformation of enrofloxacin and ofloxacin by fungus *Rhizoctonia solani*, we observed the formation of *N*-oxides.

Keywords: bioconversion, fungi, metabolism, ofloxacin, enrofloxacin**ИНСТИТУТ ПРИКЛАДНОЙ МЕХАНИКИ РАН, г. МОСКВА**

УДК 579. 872: 579 222.2

ББК 28.072

Микробиология: Биохимия и физиология микроорганизмов
03 — биологические науки**БИОПРЕВРАЩЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ
ФТОРХИНОЛОНОВ****Кандидат биологических наук И. А. Паршиков****Доктор биологических наук Е. И. Зарайский**

Реферат. Энрофлоксацин и офлоксацин являются активными антибактериальными агентами и используются в ветеринарии и медицине. В последнее время стало известно о противоопухолевых свойствах фторхинолонов. Исследованы биопревращения энрофлоксацина и офлоксацина грибом *Rhizoctonia solani*. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) показала, в жидкой среде грибок превращал каждое вещество только в один метаболит. Оба метаболита были идентифицированы на основе масс-спектров и спектров ¹H ЯМР. Продукт из энрофлоксацина (выход 14,4 % от общей площади пика при 280 нм) был определен, как *N*-окись энрофлоксацина. Продукт из офлоксацина (выход 40,0 % от общей площади пика при 280 нм) был определен, как *N*-окись офлоксацина. Таким образом, при трансформации энрофлоксацина и офлоксацина грибом *Rhizoctonia solani* мы наблюдали образование *N*-оксидов.

Ключевые слова: биопревращения, грибы, метаболизм, офлоксацин, энрофлоксацин

Введение

Фторхинолоны являются синтетическими противомикробными агентами, которые активны против широкого спектра патогенных бактерий. Двумя широко используемыми фторхинолонами являются офлоксацин и энрофлоксацин; офлоксацин используется для лечения различных бактериальных инфекций у людей [1] однако энрофлоксацин имеет ограничения только для ветеринарного использования [2].

В последнее время стало известно о возможном использовании фторхинолонов в онкологии [3].

Известно, что *N*-окиси азотистых гетероциклов, к которым относятся и фторхинолоны, являются полупродуктами в синтезе ряда практически ценных соединений [4]. Так же было установлено, что гетероциклические *N*-окисиды обладают противоопухолевыми, антибактериальными, антигипертензивными, противопаразитарными, анти-ВИЧ, противовоспалительными, гербицидными, нейропротективными и прокогнитивными свойствами. *N*-окисиды успешно использовались в ряде недавних проектов разработки лекарств [5].

В организме экспериментальных животных офлоксацин превращается в офлоксацин-*O*-глюкуронид, *N*-диметил-офлоксацин и офлоксацин-*N*-оксид [6]. Энрофлоксацин трансформируется в организме крыс в энрофлоксацин-*O*-глюкуронид и в дезэтил-энрофлоксацин (= ципрофлоксацин) в организме различных млекопитающих. В организме домашней птицы энрофлоксацин метаболизируется путем дезэтилирования и дальнейшего *N*-окисления, а также путем раскрытия пиперазинового кольца [7].

До последнего времени в литературе не было сообщений о трансформации офлоксацина грибами. Было показано, что культуры грибов бурой гнили разрушают энрофлоксацин до CO_2 и превращают в несколько других метаболитов [8]. Было установлено, что гриб *Mucor ramannianus* трансформирует энрофлоксацин в *N*-оксид энрофлоксацина, дезэтил-энрофлоксацин и *N*-ацетилципрофлоксацин [9]. В этой работе мы исследовали превращение фторхинолонов грибом *Rhizoctonia solani* с целью получения производных, которые в перспективе могли бы быть использованы в медицинской фармакологии или ветеринарии.

Материалы и методы исследования

Гриб *Rhizoctonia solani* ВКМ F-942 был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов и поддерживался на агаровых косяках [10]. Мицелий ресуспендировали с поверхности агара в 5 мл стерилизованной воды и использовали для инокуляции колб емкостью 500 мл. Каждая колба содержала 100 мл среды, содержащей (г/л): сахара — 30,0; пептон — 5,0; NaCl — 3,0; NaNO_3 — 3,0; KH_2PO_4 — 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; KCl — 0,5; FeSO_4 — 0,1; MnSO_4 — 0,001, вода водопроводная, pH 5,0. Культуры выращивали в течение 48 часов на на круговой качалке (200–220 оборотов в минуту) при 28°C.

Офлоксацин и энрофлоксацин были приобретены у компании Sigma Chemical Co. Вещества растворяли в 0,02 М растворе KOH так, что конечная концентрация каждого вещества в каждой колбе составляла 100 мг/л. После этого культуры были инкубированы еще 18 дней на качалке при температуре 28°C.

После проведения процесса трансформации биомассу отделяли фильтрацией через бумажный фильтр на воронке Бюхнера. Фильтрат упаривали на ротационном вакуумном испарителе при 50°C до 0,1 объема и экстрагировали тремя равными объемами этилацетата в делительной воронке (экстрагировать можно и неупаренный фильтрат). Экстракт упаривали в вакууме досуха и использовали для выделения продуктов трансформации. Сухой остаток растворяли в смеси метанол : ацетонитрил : уксусная кислота (10 : 10 : 2) и использовали для анализа.

Экстракт был исследован с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на жидкостном хроматографе Shimadzu (Kyoto, Япония), оснащенным PD-6AV UV-фотодиодным детектором при длине волны 280 нм, с использованием колонки Phenomenex (США) Prodigy 5 мкм ODS-3 (10-250 мм). Компонентами подвижной фазы являлись растворитель А состоящий из смеси воды и метанола (90:10) и растворитель Б состоящий из воды и метанола (10:90). Уксусная кислота (2 мл на литр) была добавлена в оба растворителя (А и Б) pH каждого был доведен до 3,0. Растворитель Б поддерживали в концентрации 10 % в течение 0,01 мин, затем повышали в течение 20 мин в линейном градиенте до

60 % и затем поддерживали так 10 мин. Затем градиент был снижен до 10 % и поддерживался в течение 5 мин. Скорость потока 2,5 мл в мин. Относительная концентрация продуктов трансформации была рассчитана по площади пика на хроматограмме при 280 нм. После выделения продуктов, они были высушены под вакуумом на роторном испарителе, растворены в метаноле и использованы для дальнейшего анализа.

Жидкостную хроматографию/масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением (ЖХ-МС-ЭРИ) проводили с помощью системы ВЭЖХ Hewlett-Packard 1090L/M и квадрупольного масс-спектрометра Hewlett-Packard 5989B. Вещества разделяли используя колонку Phenomenex Prodigy ODS-3 (2,0x250 мм). Подвижная фаза составляла 40-минутный линейный градиент от 5 % ацетонитрила / 95 % воды до 95 % ацетонитрила / 5 % воды с содержанием 0,1% муравьиной кислоты. Скорость потока 0,2 мл/мин.

Спектры протонного магнитного резонанса (^1H ЯМР) снимались на приборе Bruker AM 500 NMR (Bruker, США), вещества растворялись в дейтеро-метаноле [10].

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ ВЭЖХ экстракта культуральной жидкости гриба *Rh. solani* ВКМ F-942 дозированного энрофлоксацином показал пик энрофлоксацина при 10,0 мин и его *N*-окиси при 11,6 мин. Согласно площади пика при 280 нм относительная концентрация *N*-окиси составляла 14,4 % и 85,6 % для исходного материала. *N*-окись энрофлоксацина имела три максимума УФ-поглощения $\lambda_{\text{max}} = 274, 319$ и 330 нм.

Масс-спектр положительных ионов ЭРИ продукта трансформации энрофлоксацина состоял из ионов с m/z 376 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 360 $[\text{M}+\text{H}-\text{O}]^+$, 359 $[\text{M}+\text{H}-\text{OH}]^+$, 358 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 344 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{OH}]^+$, 315 (100) $[\text{M}+\text{H}-\text{OH}-\text{CO}_2]^+$ и 300 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{OH}-\text{CO}_2]^+$.

На основании масс-спектральных данных и спектров ^1H ЯМР (таблица 1) продукт трансформации был идентифицирован, как *N*-окись энрофлоксацина (рис. 1).

Продуктов гидроксирования энрофлоксацина обнаружено не было.

Анализ ВЭЖХ экстракта культуральной

жидкости гриба *Rh. solani* ВКМ F-942 дозированного офлоксацином показал пик офлоксацина при 9,4 мин и его *N*-окиси при 11,4 мин. Согласно площади пика при 280 нм относительная концентрация *N*-окиси составляла 40 % и 60,0 % для исходного материала. *N*-окись офлоксацина имела два максимума УФ-поглощения $\lambda_{\text{max}} = 296$ и 330 нм.

Масс-спектр положительных ионов ЭРИ продукта трансформации офлоксацина состоял из ионов с m/z 378 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 361 $[\text{M}+\text{H}-\text{OH}]^+$, 317 (100) $[\text{M}+\text{OH}-\text{CO}_2]^+$, 247 и 246.

На основании масс-спектральных данных и спектров ^1H ЯМР (таблица 1) продукт трансформации был идентифицирован, как *N*-окись офлоксацина (рис. 1). Продуктов гидроксирования офлоксацина обнаружено не было.

Биотрансформация фторхинолонов, которые имеют *N*-алкильный заместитель в пиперазиновом кольце, таких как офлоксацин и энрофлоксацин, в разных организмах может протекать разными путями. Например, модификация офлоксацина, амифлоксацина, дифлоксацина, флероксацина и пефлоксацина в организме млекопитающих происходит путем *N*-окисления алкилпиперазиновых колец [6, 11].

Известно несколько путей превращения фторхинолонов микроскопическими грибами. Грибы метаболизируют пиперазиновое кольцо путем *N*-окисления, деалкилирования, *N*-ацетилирования, удаления двух атомов углерода или полного разрушения пиперазинового кольца [12-15].

Нами была изучена трансформация фторхинолонов различными штаммами грибов, такими как *M. ramannianus* R-56 [9] и *Rh. solani* ВКМ F-942. Трансформация офлоксацина грибом *Rh. solani* ВКМ F-942 включает в себя региоселективное *N*-окисление терминального азота пиперазинового кольца, точно также, как сообщалось ранее для метаболизма энрофлоксацина грибом *M. ramannianus* [9]. Поскольку антибактериальная активность *N*-оксида энрофлоксацина намного меньше, чем у самого энрофлоксацина [12], *N*-окисление фторхинолонов грибами может снизить антибактериальную активность остаточных количеств фторхинолонов в окружающей среде после лечения ими животных.

Поскольку *N*-окиси азотистых гетеро-

циклов являются полупродуктами в синтезе ряда практически ценных соединений [4], то продукты наших биопревращений в перспективе могут быть использованы в синтезе про-

тивоопухолевых, антигипертензивных, противопаразитарных, анти-ВИЧ, противовоспалительных, нейропротективных и других фармакологических субстанций [5].

Таблица 1

¹H ЯМР спектры метаболита офлоксацина^a и энрофлоксацина полученных в результате трансформации их грибом *Rh. solani* ВКМ F-942

Протон	N-окись офлоксацина ^b	N-окись энрофлоксацина ^c
H2	8,78	8,84
H5	7,74	8,03
H8		7,71
Piperazine α	3,35; 4,00	
Piperazine β	3,32; 3,63	
Piperazine α+β		3,33; 3,62 – 3,78
H _a	1,53	
H _b	4,72	
H _c	4,40; 4,56	
H _d		3,45
H _e	3,26	1,43
H _f		3,77
H _g		1,22; 1,43

^aПробы были растворены в дейтерированном метаноле.

^bКонстанты расщепления $J_{5,F} = 12,0$; $J_{a,b} = 6,9$; $J_{b,c} = 11,6$; $J_{a,c} = 2,2$.

^cКонстанты расщепления $J_{5,F} = 12,9$; $J_{8,F} = 6,9$; $J_{f,g} = 7,1$.

N-окись энрофлоксацина

N-окись офлоксацина

Рис. 1. Структуры метаболитов N-окиси энрофлоксацина и N-окиси офлоксацина, полученные из энрофлоксацина офлоксацина.

REFERENCES

1. Monk J. P., Campoli-Richards D. M. Ofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. // *Drugs*. 1987. V. 33. P. 346-391.
2. Brown, S. A. Fluoroquinolones in animal health. // *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1996. V. 19. P. 1-14.
3. Alibek K., Bekmurzayeva A., Mussabekova A., Sultankulov B. Using antimicrobial adjuvant therapy in cancer treatment: a review. // *Infectious Agents and Cancer*. 2012. V. 7. N 33. doi: 10.1186/1750-9378-7-33
4. Katritzky A. R., Lagowsky J. M. Chemistry of the heterocyclic *N*-oxides. London and N.-Y. : Academic Press, 1971. 587 p.
5. Mfuh A. M., Larionov O. V. Heterocyclic *N*-oxides – an emerging class of therapeutic agents. // *Curr. Med. Chem.* 2015. V. 22. N 24. P.2819-2857.
6. Sudo K., Okazaki O., Tsumura M., Tachizawa H. Isolation and identification of metabolites of ofloxacin in rats, dogs and monkeys. // *Xenobiotica*. 1986. V. 16. P. 725-732.
7. Mengozzi, G., Intorre, L., Bertini, S. and Soldani G. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in sheep. // *Am. J. Vet. Res.* 1996. V. 57. P. 1040-1043.
8. Wetzstein, H.-G., Schmeer, N., Karl, W. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*: Identification of metabolites. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 4272-4281.
9. Parshikov I. A., Freeman J. P., Lay J. O. Jr., Beger R. D., Williams A. J., Sutherland J. B. Microbiological transformation of enrofloxacin by the fungus *Mucor ramannianus*. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. N 6. P. 2664 2667.
10. Parshikov I. A., Freeman J. P., Lay J. O. Jr., Beger R. D., Williams A. J., Sutherland J. B. Regioselective transformation of ciprofloxacin to *N*-acetylciprofloxacin by the fungus *Mucor ramannianus*. // *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999. V. 177. P. 131-135.
11. Carlucci C. Analysis of fluoroquinolones in biological fluids by high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. A*. 1998. V. 812. P. 343-367.
12. Wetzstein, H.-G., Karl, W., Hallenbach, W., Himmler, T. and Petersen, U. 2000. Residual antibacterial activity of metabolites derived from the veterinary fluoroquinolone enrofloxacin, p. 2 In: Abstr. 100th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. Los Angeles, USA.
13. Parshikov I. A. Microbial conversions of nitrogenous heterocycles. Moscow: Editus, 2015. 130 p.
14. Parshikov I. A. Microorganisms in Chemistry of Nitrogenous Heterocycles. Dallas: Primedia E-launch LLC, 2017. 130 p.
15. Parshikov I. A., Sutherland J. B. Microbial transformations of antimicrobial quinolones and related drugs. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V.39. N 12. P. 1731-1740.