

Механизм гидролиза бета-лактамной связи под воздействием альбумина

И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров

Витебский государственный медицинский университет, Республика Беларусь

The mechanism of hydrolysis of beta-lactam bond under the impact of albumin

I.V. Zhyltsou, I.S. Veremey, V.M. Semenov, I.I. Generalov, S.K. Egorov

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Аннотация

Настоящая работа является продолжением проводимых ранее исследований бета-лактамазной активности сыворотки крови и человеческого сывороточного альбумина (ЧСА). Нами было показано, что клавулановая кислота и тазобактам ингибируют бета-лактамазную активность сыворотки крови и ЧСА, что подразумевает наличие в молекуле альбумина активного центра. ВЭЖХ-анализ демонстрирует, что в процессе взаимодействия бензилпенициллина и альбумина происходит образование комплексов двух типов, а затем – полная диссоциация указанных комплексов, сопровождающаяся разрушением бензилпенициллина и образованием единственного продукта его распада. Компьютерное моделирование выявило в молекуле ЧСА активный центр, образованный боковыми радикалами аминокислот TYR 148, TYR 150, GLU 153, PHE 157, ARG 160, GLU 188, SER 192, LYS 195, GLN 196, LYS 199, HIS 242, CYS 245, ARG 257, HIS 288, ALA 291, GLU 292 и ASP 451. Данный активный центр отвечает за связывание с альбумином бета-лактамных антибиотиков и клавулановой кислоты. Сульбактам и тазобактам связываются с молекулой ЧСА в другом участке, образованном аминокислотными остатками PRO 384, LEU 387, ILE 388, ASN 391, GLY 434, ALA 449 и ARG 485. Получены косвенные экспериментальные данные, подтверждающие существование данного активного центра. Реконструированный механизм катализа напоминает таковой у сериновых бета-лактамаз класса А. Наиболее вероятно, что в процессе гидролиза бета-лактамной связи участвуют боковые радикалы ASP 451 (в роли донора) и ARG 222 (в роли акцептора). Возможно, механизм гидролиза неодинаков для разных антибиотиков.

Ключевые слова

Бета-лактамазная активность, человеческий сывороточный альбумин, активный центр, механизм катализа

Summary

The present work is the continuation of our previous investigations of beta-lactamase activity of blood serum and human serum albumin (HSA). We have demonstrated that clavulanic acid and tazobactam inhibit beta-lactamase activity of blood serum and HSA what assumes presence of active site in albumin molecule. HPLC analysis demonstrates that interaction of benzylpenicillin (BP) and albumin leads to formation of two types of complexes followed by complete dissociation of these complexes accompanied by cleavage of BP and release of the single product of its destruction. Computer modeling revealed the binding site in HSA molecule composed by the side chains of the amino acids TYR 148, TYR 150, GLU 153, PHE 157, ARG 160, GLU 188, SER 192, LYS 195, GLN 196, LYS 199, HIS 242, CYS 245, ARG 257, HIS 288, ALA 291, GLU 292, and ASP 451. This active site is responsible for binding of beta-lactam antibiotics and clavulanic acid. Sulbactam and tazobactam bind to HSA molecule in another region composed of amino acids residues PRO 384, LEU 387, ILE 388, ASN 391, GLY 434, ALA 449, and ARG 485. The indirect experimental data were obtained what confirm the existence of the above mentioned active site. The simulated mechanism of catalysis resembles that of serine beta-lactamases of A class. It's the most likely that side chains of ASP 451 (as electron donor) and ARG 222 (as acceptor) participate in hydrolysis of beta-lactam bond. There is a possibility that the mechanism of hydrolysis differs for different antibiotics.

Key words

Beta-lactamase activity, human serum albumin, active site, mechanism of catalysis

Введение

Феномен бета-лактамазной активности человеческой крови известен достаточно давно. Так, в 1972 г. группа исследователей компании Glaxo Research Ltd, изучая свойства недавно синтезированного ими хромогенного цефалоспоринового нитроцефина, описала значимый распад бета-лактамной связи указанного антибиотика под воздействием, в числе прочего, сыворотки человеческой крови, причем было показано, что данное ее свойство опосредуется в первую очередь альбуминовой фракцией [1]. Тем не менее, углубленное исследование данного феномена на тот момент не проводилось, реакция была сочтена неспецифической, и обнаруженное явление было забыто на много лет. В 1994 г. научный коллектив во главе с В. Nerli повторно описал феномен интенсивного распада нитроцефина под воздействием человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) [2, 3]. Попытка выявить распад некоторых других антибиотиков цефалоспоринового ряда (в частности, цефтриаксона, цефоперазона и цефсулодина) под воздействием ЧСА не увенчалась успехом, и в результате феномен необычно высокой бета-лактамазной активности человеческой крови остался незамеченным научным сообществом. В 2007 г. явление необычно интенсивного распада нитроцефина под воздействием сыворотки крови было независимо от других исследователей обнаружено нашим научным коллективом [4].

Ранее мы убедительно доказали, что бета-лактамазная активность – неотъемлемое свойство человеческой крови, и она на 86-100% обусловлена ее альбуминовой фракцией. Помимо ЧСА, большинство белковых фракций крови обладает незначительной бета-лактамазной активностью, составляющей приблизительно 9,6% от общей сывороточной. В частности, поликлональные IgG также обладают бета-лактамазной активностью, но их вклад в общую сывороточную активность не превышает 10-15%. Нами был также выявлен ряд особенностей сывороточной бета-лактамазной активности, в частности, оптимум pH, зависимость скорости реакции от температуры и ионной силы раствора, была изучена кинетика реакции распада нитроцефина, катализируемого ЧСА (соответствует реакции первого порядка с $K_m=0,115$). Было также установлено, что наличие бета-лактамазной активности ЧСА критически зависит от сохранности третичной структуры последнего, и в то же время не зави-

сит от присутствия кофакторов, что наводит на мысль о существовании в молекуле альбумина активного центра, подобного таковому у бета-лактамаз класса А [5, 6]. Тем не менее, аминокислотный состав и трехмерная структура указанного центра до сих пор не изучались. Так, неудачей окончилась попытка Нерли локализовать в молекуле альбумина активный центр, ответственный за катализ: предложенная ей пространственная структура, включающая Lys 199, Tyr 411, Trp 214, Lys 195, Lys 225, Lys 240 и His 146 [2], в действительности таковой не является, поскольку составляющие ее аминокислоты на самом деле размещаются в разных участках молекулы альбумина, далеко отстоящих друг от друга [7].

Соответственно, целью настоящего исследования было установить аминокислотный состав и пространственную организацию гипотетического активного центра в молекуле ЧСА, а также, насколько возможно, реконструировать механизм собственно катализа; мы рассматриваем данное исследование как второй этап исследования клинической значимости и практической применимости феномена бета-лактамазной активности сыворотки крови.

Материалы и методы

Сыворотка практически здоровых военнослужащих ($n=82$) была получена центрифугированием цельной свежеполученной крови, выдержанной в холодильной камере при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 4-6 часов для образования фибринового сгустка; применялось центрифугирование в угловой центрифуге при 3000 об/мин в течение 15 минут. Полученная сыворотка крови сохранялась до момента проведения эксперимента в морозильной камере при -20°C .

Кроме сыворотки крови, мы определяли бета-лактамазную активность двух препаратов ЧСА, очищенных спиртовой седиментацией по Кону [8] (полученного на Витебской областной станции переливания крови, а также произведенного Reanal, Венгрия), а также препарата ЧСА особо высокой очистки пр-ва Sigma, исходно не содержащего глобулинов (Albumin from human serum lyophilized powder, essentially globulin free, ~99%, кат. № А8763).

Для определения и количественной оценки бета-лактамазной активности сыворотки крови и препаратов IgG мы использовали хроматографическую методику, основанную на изменении окраски антибиотика цефалоспоринового ряда нитроцефина при распаде

его бета-лактаманной связи. При этом происходит bathochromный сдвиг в хромофорной системе молекулы, и окраска реакционной смеси меняется с желтой на красно-оранжевую. Максимум поглощения продукта реакции меняется с 390 нм на 486 нм, что и делает возможным спектрофотометрическую детекцию бета-лактамазной активности. Показано, что нитроцефин разрушается всеми известными бета-лактамазами [1]. Для проведения экспериментов мы использовали химически чистый нитроцефин производства Calbiochem (кат. № 484400). Бета-лактамазная активность оценивалась в % распада стандартного количества нитроцефина, вносимого в пробу.

В процессе выполнения настоящего исследования неоднократно возникала необходимость анализа и сравнения аминокислотных последовательностей изучаемых белков, в частности, первичной структуры альбумина с аминокислотными последовательностями бета-лактамаз. Указанные операции производились при помощи программ CLC Main Workbench 5.6 и Unipro UGENE v1.6.0. Информация об аминокислотных последовательностях интересующих нас белков и их фрагментов с известными функциями извлекалась из онлайн-баз данных, в частности, из базы HMMER 3 (<http://hmmer.org>) медицинского университета Говарда Хьюза (Howard Hughes) и базы Target 1 Protein Sequence (<http://www.drugbank.ca>). Информация о точном аминокислотном составе участков связывания различных лекарственных препаратов на молекуле ЧСА была получена из международного патента WO 2005/041895 [9].

В целях реконструкции пространственной структуры и аминокислотного состава активного центра в молекуле ЧСА, ответственного за связывание нитроцефина и других бета-лактамов, мы прибегли к компьютерному моделированию взаимодействия молекулы ЧСА и антибиотиков бета-лактаманного ряда (т.н. «докинг»), при этом была использована трехмерная модель молекулы ЧСА с разрешением 1,9 Å, построенная на основании данных рентгеноструктурного анализа, выполненного Wardell M. и соавт. [7]. Моделировалось взаимодействие ЧСА с амоксициллином, ампициллином, азтреонамом, бензилпенициллином, цефалексином, цефепимом, цефоперазоном, цефотаксимом, цефокситином, цефтазидимом, цефтриаксоном, клавулановой кислотой, имипенемом, нитроцефином,

пиперациллином, сульбактамом и тазобактамом. Трехмерные модели химической структуры вышеперечисленных соединений были найдены в базе PubChem Substance (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance>).

Собственно докинг осуществлялся в двух вариантах:

1. Предварительная подготовка моделей молекул к анализу выполнялась при помощи программ Vega ZZ 2.3.2.38 и MGL Tools 1.5.4, моделирование взаимодействия – при помощи программы AutoDock Vina 1.1.2, обеспечивающей соответствие результатов докинга данным рентгеноструктурных исследований вплоть до 78% [10]. Визуализация результатов докинга производилась при помощи специального модуля в составе MGL Tools 1.5.4;
2. Предварительная подготовка моделей молекул, равно как и сам докинг, выполнялись при помощи комплекса программ Schrödinger 2009. Визуализация результатов докинга производилась при помощи программы Accelrys Discovery Studio Client 2.5. Эта же программа позволила нам проанализировать механизм гидролиза бета-лактаманной связи антибиотиков под воздействием ЧСА.

В дальнейшем производилось сравнение результатов, полученных обоими способами докинга, с целью проверки их надежности и достоверности.

Был также предпринят ряд экспериментов по проверке полученных нами теоретических моделей взаимодействия ЧСА и бета-лактаманых антибиотиков. Для этого была использована информация о точной локализации участков связывания различных лекарственных препаратов на поверхности молекулы ЧСА [9]. В частности, были выполнены опыты по ингибированию бета-лактамазной активности ЧСА и сыворотки крови растворами клавуланата калия пр-ва Fluka (кат. № 33454) в концентрации 0,5 мг/мл, 1 мг/мл, 2,5 мг/мл, 5 и 10 мг/мл, а также тазобактама пр-ва Sigma (кат. № T2820) в концентрации 1 и 5 мг/мл. Кроме того, были проведены опыты по ингибированию бета-лактамазной активности ЧСА и сыворотки крови растворами фуросемида (10 мг/мл) и ацетилсалициловой кислоты (3,3 мг/мл), поскольку известно, что оба препарата связываются с молекулой альбумина практически в том же участке, что и бета-лактамы. Были использованы чистые субстанции фуросемида и ацетилсалици-

ловой кислоты отечественного производства (Борисовский завод медицинских препаратов).

Помимо этого, был проведен эксперимент, ставящий перед собой цель визуализировать процесс взаимодействия ЧСА с бензилпенициллином. Для этого смесь раствора пенициллина G (итоговая концентрация 241 мкг/мл) и ЧСА (итоговая концентрация 50 мг/мл) подавалась на вход ВЭЖХ-комплекса (HPLC System Agilent 1100 Series с хроматографической колонкой Zorbax Eclipse XDB-C18, размер частиц сорбента – 5 μm) непосредственно после смешивания и через 60 минут инкубации при 37°C; депротеинизация при этом не производилась. Предварительно были получены хроматограммы обоих компонентов смеси. Анализ взаимодействия бензилпенициллина и ЧСА производился на основании учета и сравнения наблюдаемых профилей пиков поглощения. Для данного эксперимента мы использовали химически чистую субстанцию бензилпенициллина пр-ва Sigma (кат. № P13752), и препарат ЧСА, выделенный в лаборатории Витебской областной станции переливания крови.

Результаты

Оказалось, что при исходном среднем уровне бета-лактамазной активности проб сыворотки крови 60,5% (95% CI: 57,8-63,2) воздействие клавуланата калия в концентрации 0,5 мг/мл уменьшило данную активность до 51,6% (снижение в 1,17 раз), в концентрации 1 мг/мл – до 49,3% (снижение в 1,23 раза), в концентрации 2,5 мг/мл – до 43,8% (снижение в 1,38 раз), в концентрации 5 мг/мл – до 40,8% (снижение в 1,48 раз), и в концентрации 10 мг/мл – до 38,3% (снижение в 1,58 раз). МПК₅₀ клавуланата калия, соответствующая данным цифрам, составляет 1,97 мг/мл (95% CI: 0,87-4,50).

Аналогично, под воздействием тазобактама в концентрации 1 мг/мл бета-лактамазная активность сыворотки крови снижается до 55,4% (снижение в 1,09 раза), а в концентрации 5 мг/мл – до 50,6% (снижение в 1,2 раза).

Очевидно, что и клавуланат калия, и тазобактам ингибируют бета-лактамазную активность сыворотки крови, но степень указанного ингибирования различна – в условиях равенства концентраций клавуланат калия в 1,99 раза эффективнее тазобактама. В то же время, даже клавуланат калия не подавляет бета-лактамазную активность сыворотки крови полностью, что характерно именно для конкурентного ингибирования.

И клавулановая кислота, и тазобактам представляют собой структурные аналоги бета-лактамных антибиотиков; они способны конкурентно вытеснять молекулу настоящего антибиотика бета-лактамажного ряда из активного центра бета-лактамазы, тем самым предотвращая его распад. Таким образом, оба вещества могут проявить свои свойства только при наличии некоего каталитического центра, опосредующего бета-лактамазную активность. Таким образом, полученные нами результаты подтверждают наличие в молекуле ЧСА активного центра, напоминающего таковой у бактериальных бета-лактамаз.

Обе серии экспериментов по моделированию межмолекулярных взаимодействий дали сходные результаты. Как оказалось, практически все бета-лактамные антибиотики, равно как и конкурентные ингибиторы бактериальных бета-лактамаз, связываются с молекулой ЧСА в одном и том же участке. Данный участок с очень высокой степенью вероятности включает аминокислотные остатки GLN 196, ALA 291, ARG 257, LYS 195, HIS 288, SER 192, GLU 153, GLU 292, TYR 150, GLU 188 и ARG 160. Кроме того, в состав активного центра со значительной долей вероятности могут входить также HIS 242, PHE 157, ASP 451, LYS 199, CYS 245 и TYR 148. Все вышеперечисленные аминокислоты располагаются в молекуле ЧСА недалеко друг от друга, в своеобразном углублении, называемом «гидрофобный карман» [11]. Медиана количества аминокислотных остатков, непосредственно взаимодействующих с одной молекулой антибиотика, составляет 15 (95% CI: 14-16).

Молекулы различных бета-лактамных антибиотиков могут располагаться в описанном выше довольно протяженном участке связывания по-разному, взаимодействуя, кроме перечисленных «общих» аминокислотных остатков, еще с десятком различных аминокислот, включая ASP 108, HIS 146, PRO 147, PHE 149, SER 193, CYS 200, TRP 214, ARG 218, ARG 222, TYR 452 и другие. В частности, нитроцефин всегда взаимодействует с ASP 451 и ARG 222. Особняком стоят сульбактам и тазобактам, которые связываются с молекулой альбумина в другом участке, образованном аминокислотными остатками PRO 384, LEU 387, ILE 388, ASN 391, GLY 434, ALA 449 и ARG 485. В отличие от сульбактама и тазобактама, клавулановая кислота связывается с тем же участком молекулы ЧСА, что и бета-лактамные антибиотики. Указанное явление позволяет объяснить

вдвое меньшую эффективность ингибирования бета-лактамазной активности ЧСА тазобактамом по сравнению с клавулановой кислотой в такой же концентрации.

Сравнение аминокислотных последовательностей ЧСА и различных бета-лактамаз выявило наличие у них общего участка – короткой последовательности KQRLK (лизин–глутамин–аргинин–лейцин–лизин); в первичной структуре альбумина данные аминокислоты занимают позиции со 195-й по 199-ю. В молекуле пенициллиназы blaZ аналогичные аминокислоты занимают позиции со 140-й по 144-ю [12]. Из вышеприведенных результатов молекулярного моделирования следует, что по крайней мере три аминокислоты из данной последовательности (LYS 195, GLN 196 и LYS 199) участвуют в формировании активного центра молекулы ЧСА, ответственного за сорбцию бета-лактамов антибиотиков. Можно предположить, что данные аминокислоты имеют отношение к процессу катализа, т.к. последовательность KQRLK относится к консервативным и с большим постоянством выявляется в структуре разнообразных бета-лактамаз.

Так, например, в общедоступной интернет-базе данных первичных белковых структур PROWL (<http://prowl.rockefeller.edu/>) запрос на поиск последовательности KQRLK выдает не менее 78 вхождений с различными вариантами бета-лактамаз класса А, преимущественно продуцируемых клиническими изолятами *S. aureus*, *S. epidermidis* и *E. faecalis*. Тем не менее, трехмерная визуализация молекул бета-лактамаз класса А с известным расположением активного центра ясно показывает, что искомый участок лизин–глутамин–аргинин–лейцин–лизин не только не соседствует с каталитическим боковым радикалом SER 70 – основой активного центра бета-лактамаз данного класса, но и расположен на противоположной стороне молекулы.

Таким образом, приходится признать, что цепочка аминокислот KQRLK в составе первичной последовательности бета-лактамаз выполняет сугубо структурную функцию и не имеет никакого отношения к механизму катализа. Вероятно, аналогичная последовательность в составе молекулы ЧСА также не имеет непосредственного отношения к проявлению бета-лактамазной активности альбумина, но играет структурообразующую роль, придавая оптимальную форму активному центру и способствуя правильной ориента-

ции молекул антибиотиков, необходимой для успешного катализа.

Добавление раствора фуросемида к нативной сыворотке крови приводит к снижению ее бета-лактамазной активности в 1,59 раз. В свою очередь, добавление ацетилсалициловой кислоты снижает бета-лактамазную активность сыворотки крови в 1,27 раз, а ЧСА – в 1,29 раз, что вполне сравнимо с эффективностью ингибирования клавуланатом калия и существенно превышает ингибирующий эффект тазобактама. Таким образом, на основании полученных нами косвенных данных можно констатировать, что пространственная субмолекулярная структура, образованная аминокислотными остатками TYR 148, TYR 150, GLU 153, PHE 157, ARG 160, GLU 188, SER 192, LYS 195, GLN 196, LYS 199, HIS 242, CYS 245, ARG 257, HIS 288, ALA 291, GLU 292 и ASP 451 молекулы ЧСА, по меньшей мере имеет отношение к феномену бета-лактамазной активности сыворотки крови, и, возможно, является искомым активным центром молекулы ЧСА, непосредственно осуществляющим указанный катализ.

Анализ, выполненный при помощи программы Accelrys Discovery Studio Client 2.5, выявил наиболее вероятный механизм катализа.

В роли донора электронов (восстановителя) выступает ASP 451, акцептора электронов (окислителя) – ARG 222. В процессе реакции остаток аргинина отнимает электрон у кислорода карбонильной группы бета-лактамовой связи, делая последнюю доступной для атаки молекулы воды; указанная молекула взаимодействует с амидной группой бета-лактамовой связи при посредстве восстановителя – аспарагиновой кислоты, при этом происходит передача электрона с ASP 451 на атом третичного азота через молекулу воды. Вероятно, данный процесс приводит к ацилированию амидной группы с образованием промежуточного соединения «альбумин–антибиотик». Затем происходит гидролитическое деацилирование; при этом бета-лактамовая связь разрывается, а ее карбонильная группа присоединяет гидроксил, вследствие чего образуется карбоксильная группа. В результате имеет место гидролиз бета-лактамовой связи с образованием неактивного метаболита, а активный центр ЧСА высвобождается. Правильная ориентация молекулы антибиотика в активном центре альбумина обеспечивается образованием водородных связей между полярными группировками лекарственного препарата и несущими заряд боковыми радикала-

ми входящих в состав активного центра аминокислот GLU 188, TRP 214, ALA 291 и GLU 292. В свою очередь, гидрофобные участки молекулы антибиотика взаимодействуют с боковыми радикалами LEU 198, VAL 343, VAL 344 и LEU 481.

Данный механизм представляется наиболее правдоподобным, поскольку на него указывают результаты анализа наибольшего количества моделей. Кроме того, следует напомнить, что, согласно данным компьютерного моделирования, нитроцефин всегда взаимодействует с ASP 451 и ARG 222, причем обе эти аминокислоты играют ключевую роль в вышеописанном процессе катализа.

Описанный механизм катализа в общих чертах напоминает таковой у бета-лактамаз класса А (т.н. «сериновых»). Известно, что в основе механизма катализа бета-лактамаз класса А, который изучен весьма подробно, лежит взаимодействие SER 70 с бета-лактамной связью; при этом протонированный SER 70 атакует бета-лактамную связь при посредстве молекулы воды, а перенос протона в целом осуществляется с LYS 73 на GLU 166. При этом происходит ацилирование активного центра фермента при посредстве бета-лактамного антибиотика, образуется неустойчивое промежуточное соединение «фермент-субстрат», которое очень быстро распадается вследствие гидролитического деацилирования, освобождая фермент и продукт гидролиза антибиотика [13, 14].

Впрочем, существует вероятность, что бета-лактамазная активность человеческого сывороточного альбумина обусловлена взаимодействием SER 192 с бета-лактамной связью одноименных антибиотиков при посредстве LYS 195 по механизму, сходному с таковым у сериновых бета-лактамаз (именно такой результат был получен при анализе одной из компьютерных моделей межмолекулярных взаимодействий). При этом правильное расположение молекулы антибиотика в активном центре ЧСА будет обусловлено взаимодействием с боковыми радикалами аминокислот TYR 150, GLU 153, PHE 157, GLN 196, ALA 291 и GLU 292. Возможно также, что механизм гидролиза бета-лактамной связи неодинаков для разных антибиотиков.

Результаты выполненного нами ВЭЖХ-анализа показаны на рис. 1.

На хроматограмме чистого бензилпенициллина (Рис. 1А) хорошо виден пик, соответствующий антибиотику, со временем удержания $\approx 8,9$ минут.

На хроматограмме человеческого сывороточного альбумина (Рис. 1В) определяется два основных пика: пик №1 со временем удержания $\approx 1,19$ минуты соответствует собственно альбумину, а пик №2 со временем удержания $\approx 1,63$ минуты, вероятно, соответствует примеси альфа-глобулинов.

На хроматограмме смеси ЧСА и бензилпенициллина непосредственно после смешивания (Рис. 1С) видны два дополнительных пика со временем удержания 1,44 и 2,32 минуты; вероятно, данные пики представляют собой две разновидности комплексов альбумина с бензилпенициллином, при этом пик, соответствующий чистому бензилпенициллину, не определяется. Хорошо заметно, что магнитуда и площадь под кривой (AUC) основного пика альбумина уменьшились пропорционально возрастанию магнитуды и AUC дополнительных пиков, соответствующих комплексам ЧСА с бензилпенициллином.

На хроматограмме смеси человеческого сывороточного альбумина и бензилпенициллина через 60 минут инкубации при 37°C (Рис. 1D) видно, что комплексы альбумина с бензилпенициллином распались и освободили неизменённый ЧСА (его пик идентичен таковому на хроматограмме В по времени удержания, магнитуде и AUC). Пик, соответствующий чистому бензилпенициллину, не определяется, но выявляется отсутствовавший ранее пик со временем удержания $\approx 5,9$ минут, вероятно, соответствующий основному продукту распада бензилпенициллина – пенициллоиловой кислоте.

Таким образом, нам удалось визуализировать 1) образование комплексов «ЧСА–бензилпенициллин» двух типов; 2) диссоциацию указанных комплексов спустя 60 минут инкубации при 37°C, сопровождающуюся разрушением бензилпенициллина и образованием единственного продукта его распада. Описанная картина хорошо согласуется с гипотетической, полученной нами в результате компьютерного моделирования взаимодействия ЧСА и бета-лактамных антибиотиков, что является еще одним практическим доказательством справедливости наших теоретических построений.

Выводы

1. Клавулановая кислота и, в меньшей степени, тазобактам способны существенно снижать бета-лактамазную активность сыворотки крови и ЧСА, что подразумевает наличие в молекуле ЧСА активного центра наподобие тако-

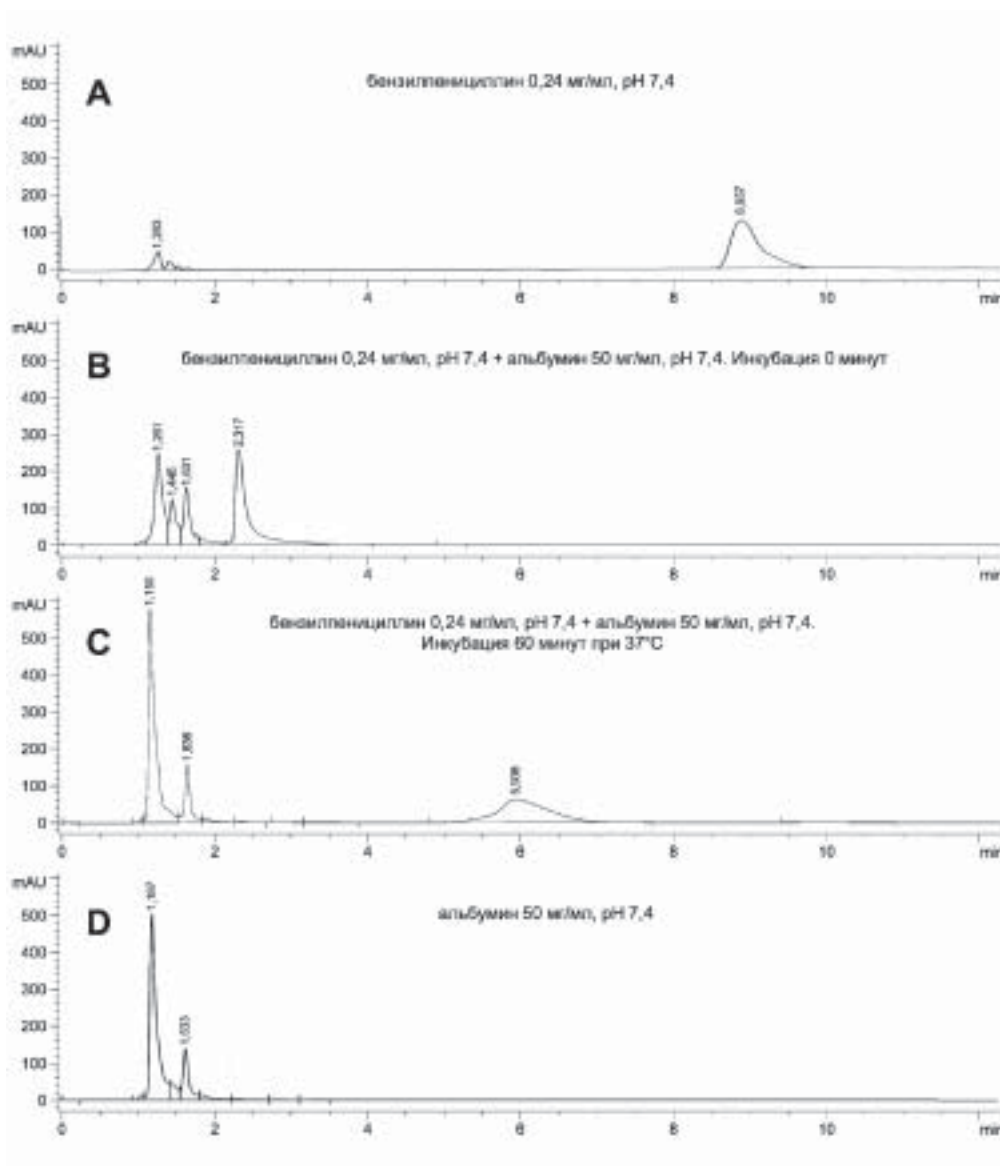


Рис. 1. ВЭЖХ-анализ взаимодействия бензилпеницилина с ЧСА

- вого у бактериальных бета-лактамаз. МПК₅₀ клавуланата калия составляет 1,97 мг/мл;
- В процессе взаимодействия бензилпеницилина и альбумина происходит образование комплексов «ЧСА–бензилпенициллин» двух типов, а затем – полная диссоциация указанных комплексов к исходу первого часа инкубации при 37°C, сопровождающаяся разрушением бензилпеницилина и образованием единственного продукта его распада;
 - В составе молекулы альбумина имеется активный центр, образованный боковыми радикалами аминокислот TYR 148, TYR 150, GLU 153, PHE 157, ARG 160, GLU 188, SER 192, LYS 195, GLN 196, LYS 199, HIS 242, CYS 245,

- ARG 257, HIS 288, ALA 291, GLU 292 и ASP 451. Данный активный центр отвечает за связывание с альбумином всех бета-лактамных антибиотиков и клавулановой кислоты. Сульбактам и тазобактам связываются с молекулой ЧСА в другом участке, образованном аминокислотными остатками PRO 384, LEU 387, ILE 388, ASN 391, GLY 434, ALA 449 и ARG 485, что объясняет вдвое меньшую эффективность ингибирования бета-лактамазной активности сыворотки крови тазобактамом по сравнению с клавуланатом калия аналогичной молярности;
- Реконструированный механизм катализа напоминает таковой у сериновых бета-лактамных

маз класса А. В процессе катализируемого альбумином гидролиза бета-лактамной связи участвуют боковые радикалы ASP 451 и ARG 222, причем ASP 451 выступает в роли донора электронов, а ARG 222 – акцептора.

Боковой радикал SER 192 также может взаимодействовать с бета-лактамной связью при посредстве LYS 195 и GLU 153, причем боковой радикал серина является донором электронов, а лизина – акцептором.

Литература

1. O'Callaghan C.H., Morris A., Kirby S.M., Shingler A.H. Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1972 Apr; 1 (4): 283-8.
2. Nerli B., Garsna F., Picy G. An unknown hydrolase activity of human serum albumin: beta-lactamase activity. *Biochem Mol Biol Int.* 1995 Nov; 37 (5): 909-15.
3. Nerli B., Picy G. Evidence of human serum albumin beta-lactamase activity. *Biochem Mol Biol Int.* 1994 Mar; 32 (4): 789-95.
4. Жильцов И.В., Веремей И.С., Семенов В.М., Генералов И.И. Необычно высокий уровень распада антибиотиков бета-лактамной группы в человеческой плазме и сыворотке крови. Материалы Евро-Азиатского Конгресса по инфекционным болезням. Витебск, 2008; (1): 85-6.
5. Жильцов И.В., Веремей И.С., Семенов В.М., Генералов И.И., Егоров С.К. Исследование природы бета-лактамазной активности сыворотки крови человека. Сборник материалов конференции «Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации» (65-я научная сессия сотрудников ВГМУ, 24-25 марта 2010 г.). Витебск, 2010: 189-192.
6. Жильцов И.В., Веремей И.С., Семенов В.М., Генералов И.И., Егоров С.К. Природа бета-лактамазной активности сыворотки крови. Материалы Первого конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням. Журнал инфектол. 2010; 4 (2): 67-8.
7. Wardell M., Wang Z., Ho J.X., Robert J., Ruker F., Ruble J., Carter D.C. The atomic structure of human methemalbumin at 1.9 Å. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Mar 8; 291 (4): 813-9.
8. Сивакова Н.П. и др. Способы получения иммуноглобулинов для внутривенного введения и их клиническое применение. *Трансфузиология.* 2008; 1 (9): 4-12.
9. International Patent WO 2005/041895 A2, 12 May, 2005: 16-22.
10. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010 Jan 30; 31 (2): 455-61.
11. Dugaiczak A., Law S.W., Dennison O.E. Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human serum albumin mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Jan; 79 (1): 71-5.
12. O'Brien F.G., Price C., Grubb W.B., Gustafson J.E. Genetic characterization of the fusidic acid and cadmium resistance determinants of *Staphylococcus aureus* plasmid pUB101. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Sep; 50 (3): 313-21.
13. Meroueh S.O., Fisher J.F., Schlegel H.B., Mobashery S. Ab initio QM/MM study of class A beta-lactamase acylation: dual participation of Glu166 and Lys73 in a concerted base promotion of Ser70. *J Am Chem Soc.* 2005 Nov 9; 127 (44): 15397-407.
14. Hermann J.C., Pradon J., Harvey J.N., Mulholland A.J. High level QM/MM modeling of the formation of the tetrahedral intermediate in the acylation of wild type and K73A mutant TEM-1 class A beta-lactamase. *J Phys Chem A.* 2009 Oct 29; 113 (43): 11984-94.

Сведения об авторах:

Автор, ответственный за переписку с редакционной коллегией:

Жильцов Иван Викторович – к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней УО ВГМУ

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 73

Кафедра инфекционных болезней УО ВГМУ

Тел./факс: +375 (212) 24-33-46

Моб. тел.: +375 (29) 710-43-68

E-mail: zhylytsou@tut.by

Веремей Игорь Святославович – старший научный сотрудник ЦНИЛ УО ВГМУ

Семенов Валерий Михайлович – д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней УО ВГМУ, декан лечебного факультета УО ВГМУ

Генералов Игорь Иванович – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии УО ВГМУ

Егоров Сергей Константинович – студент 6 курса лечебного факультета УО ВГМУ

Поступила 4.08.2011 г.