

И.В. Жильцов

ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА БЕТА-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА**Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
г. Витебск, Республика Беларусь**

Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) обладает собственной бета-лактамазной активностью и способен гидролизовать бета-лактамную связь в молекулах многих антибиотиков из одноименной группы. Целью настоящей работы было выявление особенностей механизма бета-лактамазной активности человеческого сывороточного альбумина. Объектом исследования послужили сыворотки крови 5 здоровых доноров с относительно высоким уровнем бета-лактамазной активности, а также особо чистый препарат ЧСА производства Sigma-Aldrich. Для количественной оценки бета-лактамазной активности проб крови использовали спектрофотометрическую методику, основанную на регистрации распада бета-лактамной связи синтетического цефалоспорино нитроцефина. Нами установлено, что ингибирование бета-лактамазной активности сывороточного альбумина клавулановой кислотой не является конкурентным. В составе молекулы альбумина, вероятно, имеется два активных центра, ответственных за проявление его бета-лактамазной активности, причем один из них не взаимодействует с клавулановой кислотой, а другой – необратимо ею ингибируется. Указанная информация может представлять интерес для разработки новых бета-лактамных антибиотиков, а также для разработки стратегий преодоления «эндогенной» резистентности к бета-лактамным антибиотикам.

Ключевые слова: *человеческий сывороточный альбумин, бета-лактамазная активность, механизм катализа, ингибиторы бета-лактамаз класса А, бета-лактамные антибиотики.*

ВВЕДЕНИЕ

Как известно в настоящее время, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) способен проявлять собственную бета-лактамазную активность, разрушая молекулы ряда антибиотиков из группы бета-лактамов. В составе молекулы ЧСА определённо существует активный центр (возможно, несколько), устроенный наподобие такового у «настоящих» энзимов, в частности бета-лактамаз класса А, продуцируемых многими бактериями.

В наших предыдущих исследованиях был продемонстрирован феномен распада отдельных бета-лактамных антибиотиков из всех четырёх классов (пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов и монобактамов), катализируемого сывороточным альбумином. В частности, нами доказан распад как минимум 4 антибиотиков бета-лактамного ряда (бензилпенициллина, цефалексина, азтреонама и имипенема) под воздействием ЧСА. В случае бензилпенициллина был строго доказан и факт

гидролиза именно бета-лактамной связи при таком распаде [1].

Попутно было установлено, что бета-лактамазная активность ЧСА существенно снижается под воздействием ингибиторов бактериальных бета-лактамаз класса А, в частности клавулановой кислоты и тазобактама. Это послужило основанием для разработки рекомендаций по назначению стартовой антибактериальной терапии пациентам с высоким естественным уровнем бета-лактамазной активности крови [2]. Тем не менее, собственно механизм ингибирования ранее нами не изучался. Согласно общепринятым представлениям, ингибиторы бета-лактамаз класса А структурно подобны бета-лактамным антибиотикам. Ввиду этого они обладают способностью конкурентно связываться с активным центром бактериальных бета-лактамаз, после чего необратимо его ингибируют из-за образования ковалентной связи с ключевым остатком Ser 70. Таким образом, они являются так называемыми «суицидальными субстратами» (suicide substrate) [3].

Нами были получены косвенные свидетельства того, что клавулановая кислота ингибирует бета-лактамазную активность ЧСА конкурентно и обратимо, поскольку в эксперименте по постепенному увеличению концентрации клавулановой кислоты в реакционной среде была получена кинетическая кривая, характерная для ферментативной реакции в условиях динамического равновесия между субстратом и ингибитором реакции. Это характерно именно для конкурентного ингибирования [4]. Следовательно, механизм катализа, реализуемый ЧСА, должен существенно отличаться от механизма, характерного для бактериальных бета-лактамаз, что указывает на значительную разницу в структуре и организации их активных центров. Однако, как упоминалось выше, исследование механизма гидролиза бета-лактамной связи антибиотиков, опосредуемого альбумином, не входило в цели наших предыдущих исследований, ввиду чего прямые указания на особенности данного механизма до настоящего момента отсутствуют. Знание указанных особенностей может представлять существенный интерес для определения тактики использования ингибитор-защищенных бета-лактамов у пациентов с «эндогенной» устойчивостью к антибиотикам бета-лактамного ряда. Кроме того, полученная информация может быть использована при разработке новых ингибиторов различных бета-лактамаз, продуцируемых микроорганизмами.

Соответственно целью нашего исследования было уточнение механизма ингибирования бета-лактамазной активности ЧСА клавулановой кислотой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили сыворотки крови 5 практически здоровых доноров, продемонстрировавшие относительно высокий (более 75 %) уровень бета-лактамазной активности. Для количественной оценки бета-лактамазной активности проб крови мы использовали известную спектрофотометрическую методику, основанную на регистрации распада бета-лактамной связи синтетического цефалоспоринового нитроцефина ((7R)-3-((E)-2,4-динитростерил)-7-(2-тиенилацетамидо)-3-цефем-4-карбоксилатная кислота). При этом максимум поглощения основного

продукта гидролиза меняется с 390 нм на 486 нм, что обуславливает выраженное изменение цвета раствора с жёлтого на красный. Именно это делает возможной спектрофотометрическую детекцию гидролиза бета-лактамной связи нитроцефина с сопутствующим определением количества распавшегося в пробе субстрата-хромогена [5].

Для исследования природы ингибирования альбумина клавулановой кислотой использовали феномен восстановления ферментативной активности после её конкурентного ингибирования при существенном повышении концентрации субстрата реакции, который вытесняет конкурентный ингибитор из активного центра фермента; в случае необратимого ингибирования подобного не наблюдается [6].

В контрольные пробы вносили по 20 мкл субстрата (нативной сыворотки крови или раствора химически чистого ЧСА производства Sigma-Aldrich (CAS 70024-90-7), в концентрации 40 мг/мл), 45 мкл раствора нитроцефина (0,1 мг/мл) и 0,1 М фосфатный буферный раствор до общего объёма 200 мкл. В опытные пробы, помимо субстрата и раствора нитроцефина, добавляли 115 мкл раствора клавулановой кислоты (5 мг/мл) и 0,1 М фосфатный буферный раствор до общего объёма 200 мкл (в часть проб – до общего объёма 180 мкл). Инкубацию проб производили при температуре 37° С в течение 30 минут; после этого в те опытные пробы, объём которых составлял 180 мкл, добавляли 20 мкл раствора нитроцефина в концентрации 0,25 мг/мл, что соответствовало количеству исходно вносимого в пробы нитроцефина (≈4,5 мкг). После этого производили измерение оптической плотности проб при длине волны 492 нм с использованием фотометра универсального Ф300 ТП производства ОАО «Витязь». Учет количества распавшегося в пробе нитроцефина проводили в соответствии с формулой, приведённой в инструкции по применению тест-системы «БиоЛактам» [7]. Предполагалось, что добавление в пробу, в которую уже была добавлена клавулановая кислота, дополнительного количества нитроцефина приведёт к конкурентному вытеснению клавуланата из активного центра (либо центров) ЧСА, ответственного за проявление бета-лактамазной активности последнего. В результате должно наблюдаться

полное либо частичное восстановление исходного уровня бета-лактамазной активности анализируемой пробы. Если этого не произойдёт, то взаимодействие активного центра ЧСА и клавулановой кислоты придётся признать неконкурентным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех исследованных пробах человеческой сыворотки крови бета-лактамазная активность после добавления раствора клавулановой кислоты в заведомо избыточной концентрации 5 мг/мл снизилась на 20–25 % (в среднем на $22,1 \pm 1,6$ %) от исходного уровня, но не была полностью нейтрализована.

После того как в соответствующие пробы был добавлен раствор нитроцефина в количестве, эквивалентном $\approx 4,5$ мкг чистой субстанции, бета-лактамазная активность в указанных пробах практически не изменилась (произошло повышение указанной активности на $0 \dots 3$ %, в среднем – на $1,33 \pm 1,08$ %). Можно констатировать, что повышения уровня бета-лактамазной активности, предварительно сниженного добавлением клавулановой кислоты, после добавления избытка субстрата каталитической реакции не произошло, как можно было бы ожидать, если бы клавулановая кислота конкурентно ингибировала указанную активность.

Для проверки того, насколько наблюдаемая картина является типичной, мы провели эксперимент с аналогичным дизайном, используя вместо сыворотки человеческой крови особо чистый раствор ЧСА производства Sigma-Aldrich (CAS 70024-90-7). ЧСА содержал собственно альбумина ≥ 99 %, был исходно свободен от примесей глобулинов и предназначался для использования в качестве стандарта при проведении электрофореза в агарозном геле [8]. Концентрация альбумина в указанном растворе составила 40 мг/мл, что соответствует среднестатистическому содержанию альбумина в сыворотке крови здорового человека. Исходная бета-лактамазная активность свежеприготовленного раствора особо чистого альбумина в вышеуказанной концентрации составила 75,6 %.

После добавления раствора клавулановой кислоты в концентрации, идентичной предыдущему эксперименту, уровень бета-лактамазной активности раствора снизил-

ся на 33,8 % от исходного. При этом последующее добавление избытка субстрата реакции (нитроцефина) привело не к росту, а к снижению бета-лактамазной активности (на 2,1 % от уровня, зарегистрированного до добавления нитроцефина в пробу). Таким образом, бета-лактамазная активность особо чистого препарата ЧСА в эксперименте ведёт себя так же, как и бета-лактамазная активность проб человеческой сыворотки крови: после добавления раствора клавулановой кислоты в концентрации 5 мг/мл снижается примерно на треть от исходного уровня, после чего не реагирует на добавление избытка субстрата реакции (нитроцефина) восстановлением до прежних цифр.

На основании анализа полученной в настоящем эксперименте информации складывается впечатление, что клавулановая кислота *неконкурентно и необратимо* ингибирует бета-лактамазную активность ЧСА, но почему-то не всю, а 20–30 % указанной активности в абсолютном выражении. При этом данная закономерность воспроизводится и для эталонного препарата особо чистого альбумина, и для образцов сыворотки человеческой крови. Наиболее логичным представляется объяснение указанного феномена тем, что в молекуле ЧСА существует не один, а как минимум два активных центра, ответственных за проявление бета-лактамазной активности. Один из них, вероятно, структурно подобен активному центру бактериальных бета-лактамаз класса А, вследствие чего необратимо ингибируется клавулановой кислотой; данный активный центр опосредует ≈ 20 –30 % суммарной бета-лактамазной активности ЧСА. Второй активный центр, соответственно, опосредует 70–80 % суммарной бета-лактамазной активности ЧСА. При этом его структура принципиально отличается от структуры активного центра бактериальных бета-лактамаз класса А, ввиду чего указанный центр совершенно не взаимодействует с ингибиторами бета-лактамаз и, в частности с клавулановой кислотой.

Выполненные нами ранее эксперименты по моделированию взаимодействия молекулы ЧСА с молекулами бета-лактамных антибиотиков подтверждают вышеприведённые рассуждения. Согласно результатам компьютерного докинга, в составе молекулы альбумина имеется два

участка, способных связывать антибиотики бета-лактаминового ряда, причём некоторые антибиотики могут связываться только с первым, а некоторые – только со вторым участком [2].

ВЫВОДЫ

1. Бета-лактаминазная активность сыворотки человеческой крови и ЧСА ингибируется клавулановой кислотой не более чем на 20–30 %, причём указанное ингибирование является неконкурентным и необратимым.

2. Данный феномен, вероятно, связан с тем, что в составе молекулы альбумина имеется как минимум два вида активных центров, разрушающих молекулы бета-лактаминных антибиотиков. Один из них структурно подобен активному центру бета-лактаминаз класса А, опосредует не более 30 % суммарной бета-лактаминазной активности ЧСА и необратимо ингибируется клавулановой кислотой. Другой центр опосредует ≈70 % суммарной бета-лактаминазной активности ЧСА и структурно отличается от активного центра бактериальных бета-лактаминаз, ввиду чего не взаимодействует с их ингибиторами, включая клавулановую кислоту.

Описанное в данной публикации явление должно быть принято во внимание при использовании ингибитор-защищённых бета-лактаминных антибиотиков у пациентов с высоким уровнем «эндогенной» резистентности к бета-лактаминам, а также при разработке новых ингибиторов бактериальных бета-лактаминаз.

SUMMARY

I. V. Zhyltsou FEATURES OF THE MOLECULAR MECHANISM OF BETA-LACTAMINASE ACTIVITY OF HUMAN SERUM ALBUMIN

Human serum albumin (HSA) possesses its own beta-lactaminase activity and is able to hydrolyze beta-lactamin bond in the molecules of many antibiotics of the same group. The aim of this work was to identify the features of the mechanism of beta-lactamin activity of HSA. The object of the study was blood sera of 5 healthy donors with a relatively high level of beta-lactaminase activity as well as especially pure preparation of HSA produced by Sigma-

Aldrich. For quantitative assessment of beta-lactaminase activity of blood samples a spectrophotometric technique was used based on the registration of beta-lactamin bond breakdown of synthetic cephalosporin nitrocefin. We found that inhibition of beta-lactaminase activity of serum albumin by clavulanic acid is not competitive. The albumin molecule probably contains two active centers responsible for the manifestation of its beta-lactaminase activity one of which does not interact with clavulanic acid and the other one is irreversibly inhibited by it. This information may be of interest for the development of new beta-lactamin antibiotics as well as for the development of strategies to overcome "endogenous" resistance to beta-lactamin antibiotics.

Keywords: human serum albumin, beta-lactaminase activity, catalysis mechanism, class A beta-lactaminase inhibitors, beta-lactamin antibiotics.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кинетика распада некоторых бета-лактаминных антибиотиков под воздействием человеческого сывороточного альбумина / И. В. Жильцов [и др.] // Вестник фармации. – 2011. – № 3 (53). – С. 73–80.
2. Жильцов, И.В. Устойчивость к бета-лактаминам антибиотикам: природа и клиническое значение (монография) / И. В. Жильцов, В. М. Семенов, Т. И. Дмитраченко // Витебск : ВГМУ. – 2011. – 187 с.
3. Yang, Y. Class A beta-lactaminases – enzyme-inhibitor interactions and resistance / Y. Yang, B. A. Rasmussen, D. M. Shlaes / Pharmacol. Ther. – 1999. – Vol. 83, № 2. – P. 141–151.
4. Enzyme Assays: A Practical Approach / R. Eienthal, M. Danson / Oxford University Press, USA. – 2nd edition (June 20, 2002). – 302 p.
5. Novel method for detection of b-lactaminases by using a chromogenic cephalosporin substrate / H.C. O'Callaghan [et al.] // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1972. – Vol. 1, № 4. – P. 283–288.
6. Harold, C. Clavulanic Acid, a Novel Inhibitor of β -Lactaminases / C. Harold, P. Kwung / Antimicrob. Agents Chemother. – 1978. – Vol. 14 (№5). – P. 650–655.
7. Тест-система «Биолактамин» для определения бета-лактаминазной активности биологических субстратов:

ТУ ВУ 391353648.001-2011. – Введ. 06.07.11. – Минск: государственный комитет по стандартизации Республики Беларусь, 2011. – 12 с.

8. Albumin from human serum. Lyophilized powder, essentially globulin free, ≥ 99 % (agarose gel electrophoresis) / Онлайн-каталог Merck [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a8763?lang=en®ion=BY>. – Дата доступа: 13.02.2020.

Адрес для корреспонденции:

210009, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет»,
кафедра персонализированной
и доказательной медицины ФПК и ПК,
тел. +375 29 710 43 68,
e-mail: zhyltsou@tut.by,
Жильцов И. В.

Поступила 14.02.2020 г.