

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Оренбургский государственный университет имени В.А. Бондаренко»

На правах рукописи

ПЛОТНИКОВА ЮЛИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СТАБИЛИЗАЦИИ БЕЛОК-ЛИ-
ГАНДНЫХ КОМПЛЕКСОВ И МОДУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ КЛЮЧЕ-
ВЫХ БЕЛКОВ-МИШЕНЕЙ: ПЕНИЦИЛЛИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА
И β -ЛАКТАМАЗ.**

1.5.4. Биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Барышева Елена Сергеевна

Оренбург - 2026

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Роль биохимической модификации β -лактамовых антибиотиков в современной антибактериальной терапии.....	15
1.2 Механизм и особенности синтеза пептидогликана	18
1.2.1 Этапы биосинтеза пептидогликана	18
1.2.2 Этапы формирования липид-связанных предшественников.....	21
1.2.3 Полимеризация и сшивка пептидогликановых цепей.....	21
1.2.4 Роль РВР в биосинтезе пептидогликана	22
1.2.5 Этапы биосинтеза липида II.....	23
1.2.6 Пространственная организация трангликозилирования.....	24
1.2.7 Транспептидация и интеграция новой цепи.....	24
1.2.8 Структурно-функциональная роль РВР класса А.....	25
1.2.9 Механизм действия β -лактамов на пептидогликан	26
1.2.10 Взаимодействие РВР с β -лактамами	32
1.3 Индуцированные конформационные изменения РВР3 в комплексе с цефтазидимом.....	33
1.4 Выработка β -лактамаз и изменения РВР, как механизмы резистентности к цефалоспорином.....	35
1.5 Противомикробные препараты фенольного происхождения.....	43
1.5.1 Механизмы ингибирования антибактериальных агентов фенольного происхождения.....	43
1.5.2 Комбинации фенольных фитометаболитов и антибактериальных препаратов	46
1.5.3 Химия белок-фенольных взаимодействий	52
Заключение к обзору литературы.....	54
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	56
2.1 Характеристики объектов исследования.....	56

2.1.1 Характеристика цефтазидима.....	56
2.1.2 Бактериальные штаммы.....	58
2.1.3 Фенольные фитометаболиты.....	59
2.1.4 Бактериальные белки-мишени.....	60
2.2. Методы исследования.....	60
2.2.1 Спектральный анализ.....	61
2.2.2 Моделирование взаимодействия между фенольными соединениями, антибиотиком и бактериальными белками-мишенями.....	62
2.2.3 Тестирование на присутствие β -лактамаз.....	65
2.2.4 Оценка антибактериального действия исследуемых веществ в отношении микроорганизмов с применением диффузионного метода агаровых лунок.....	66
2.2.5 Статистическая обработка и анализ данных.....	67
Заключение к главе материалы и методы исследования.....	68
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	70
3.1 Анализ формирования межмолекулярного взаимодействия комплексов цефтазидима с фенольными фитометаболитами.....	70
3.2 Молекулярное моделирование взаимодействий цефтазидима и фенольных фитометаболитов с бактериальными белками-мишенями.....	72
3.2.1 Оценка аффинности исследуемых соединений к РВР 3.....	72
3.2.2 Оценка аффинности исследуемых соединений к BlaZ.....	75
3.2.3 Оценка аффинности исследуемых соединений к ОХА-10.....	79
3.3 Анализ образования водородных связей фенольных фитометаболитов и цефтазидима с аминокислотами белков-мишеней.....	81
3.3.1 Характеристика возникновения водородных связей между цефтазидимом и аминокислотами белков-мишеней.....	82
3.3.2 Характеристика возникновения водородных связей между кверцетином и аминокислотами белков-мишеней.....	87
3.3.3 Характеристика возникновения водородных связей между галловой кислотой и аминокислотами белков-мишеней.....	89

3.3.4 Характеристика возникновения водородных связей между рутином и аминокислотами.....	91
3.4 Оценка вероятности возникновения межмолекулярных взаимодействий цефтазида и фенольных фитометаболитов.....	93
3.5 Оценка бактерицидной активности фенольных фитометаболитов и их комплексов с цефтазидимом.....	97
3.6 Статистическая обработка данных квантового анализа.....	102
3.6.1 Показатели эффективности веществ.....	103
3.6.2 Визуальная оценка данных.....	105
3.6.3 Определение значимых различий между исследуемыми веществами...	116
3.6.4 Анализ распределения показателей по кластерам внутри веществ.....	121
3.6.5 Сравнение отдельных кластеров.....	124
3.6.6 Анализ методом главных компонент (РСА).....	125
3.6.7 Оценка влияния типа вещества на исследуемые показатели эффективности.....	130
3.6.8 Анализ влияния молекулярной структуры на активность исследуемых веществ.....	137
3.7 Заключение по статистическому анализу данных квантового моделирования.....	143
3.8 Согласованность комплексных данных статистического анализа и результатов диско-диффузионного метода агаровых лунок.....	146
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	149
ВЫВОДЫ.....	151
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	153
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	173
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	185

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

PBP - пенициллин-связывающие белки

β -лактамы - β -лактамные антибиотики

MSSA - Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (метициллин-чувствительный золотистый стафилококк)

MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (метициллин-резистентный золотистый стафилококк)

БЛРС - β -лактамазы расширенного спектра

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

AMF - аминогликозид-модифицирующий фермент

AAC - ацетилтрансфераза

APH - фосфотрансфераза

ANT - нуклеозидтрансфераза

АТФ - натрия аденозинтрифосфат

PBD - пенициллин-связывающий домен

ABC - суперсемейство АТФ-связывающих кассетных транспортеров

MFS - суперсемейство мембранных транспортеров (major facilitator superfamily)

RND - резистентность-нодуляция-деление (resistance-nodulation-division)

SMR - семейство с малой множественной лекарственной устойчивостью (small multidrug resistance)

MATE - семейство мульти-антимикробных экструзионных белков (multidrug and toxin extrusion)

MET - мультилекарственных эндосомальных переносчиков

OMP - белок внешней мембраны

PMF - протонная движущая сила

ТМД - трансмембранный домен

НСД - нуклеотид-связывающий домен

MBL - металло- β -лактамазы

HMM PBP - высокомолекулярный пенициллин-связывающий белок
LMM PBP - низкомолекулярный пенициллин-связывающий белок
МЭП - молекулярно-электростатический потенциал
АСМ - атомно-силовая микроскопия
ТСХ - тонкослойная хроматография
QS - чувство кворума
рРНК - рибосомальная рибонуклеиновая кислота
SCCmec - хромосомная кассета золотистого стафилококка
ГТ - гликозилтрансфераза
СМ - цитоплазматическая мембрана
РГ - пептидогликан
ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
ЭК - эпикатехин
ЭГК - эпигаллокатехин
ЭКГ - ЕС-3-галлат
ЭГКГ - ЭГК-3-галлат
Glu - остаток глутамата
Arg - остаток аргинина
Asp - остаток аспарагиновой кислоты
Asn - остаток аспарагина
Ser - остаток серина
Lys - остаток лизина
Ala - остаток аланина
Tyr - остаток тирозина
Phe - остаток фенилаланина
Val - остаток валина
Gly - остаток глицина
Thr - остаток треонина
Cys - остаток цистеина
Asn - остаток аспарагина

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы.

Антибиотикорезистентность бактерий признана Всемирной организацией здравоохранения одной из главных угроз глобальному здравоохранению XXI века. В 2019 году антибиотикорезистентность напрямую стала причиной 1,27 млн смертей (Naghavi et al., 2024); к 2023 году каждый шестой случай распространённой бактериальной инфекции был обусловлен резистентными бактериями (WHO GLASS, 2025). При сохранении тенденций к 2050 году прямые смерти от антибиотикорезистентности могут достичь 1,91 млн. человек в год, а ассоциированные - 8,22 млн (Naghavi et al., 2024). В обновлённом Списке приоритетных бактериальных патогенов (WHO, 2024) *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* отнесены к высокому уровню приоритетности, что подчёркивает необходимость разработки новых подходов к преодолению их резистентности.

β -лактамы антибиотиков (β -лактамы) остаются фундаментальной основой современного антибактериального арсенала (Alfei et al., 2022; Kim et al., 2023; Pandey et al., 2023). Основной мишенью β -лактамов в клетке *P. aeruginosa* служит пенициллин-связывающий белок 3 (PBP3) - транспептидаза класса В, катализирующая сшивки пептидогликана. Цефтазидим блокирует PBP3 путём ковалентного ацетилирования серинового остатка активного центра. Эффективность этого механизма ограничена мутациями в *ftsI*, снижающими аффинность PBP3 к цефтазидиму, и продукцией β -лактамаз, гидролизующих β -лактамное кольцо до достижения мишени (Al-Bakri et al., 2024; Lee et al., 2025).

Клинически подтверждённый подход к преодолению β -лактамазной резистентности - комбинированная терапия с ингибиторами β -лактамаз (цефтазидим/авибактам, цефтолозан/тазобактам, имипенем/релибактам). Однако он имеет принципиальные ограничения. Авибактам не активен против металло- β -лактамаз класса В, доминирующих среди карбапенемаз *P. aeruginosa* в ряде регионов (Rees-Cleland et al., 2024). По данным метаанализа (Wang et al., 2025), резистентность грамотрицательных бактерий к цефтазидиму-авибактаму выросла с 5,6% в 2015-

2020 годах до 13,2% в 2021-2024 годах, а среди неферментирующих бактерий достигла 25,8%. Кроме того, ингибиторы β -лактамазного типа не затрагивают мутации мишени (РВРЗ), оставляя значительную часть резистентности вне сферы действия. Поиск адъювантов с принципиально иным механизмом взаимодействия с молекулярными мишенями, potenziрующих действие антибиотика по нескольким направлениям, - актуальная нерешённая задача.

Выбор трёх соединений с различными структурно-функциональными характеристиками - кверцетина (флавонол с пятью свободными гидроксильными группами и высокой конформационной гибкостью), рутина (3-рутинозид кверцетина с дополнительными гидроксильными группами и ограниченной подвижностью) и галловой кислоты (фенолкарбоновая кислота с депротонированной при физиологическом pH карбоксильной группой) - позволяет выявить структурно-функциональные закономерности, определяющие антибиотикопотенцирующую активность на молекулярном уровне. Аддитивный эффект комбинации цефтазидима и фитометаболитов может реализоваться через несколько одновременных механизмов: (1) ингибирование β -лактамаз с повышением эффективной концентрации антибиотика в периплазме; (2) конформационную модуляцию РВРЗ, сохраняющую доступность каталитического серина для ацетилирования; (3) прямое антибактериальное действие - нарушение целостности мембраны, ингибирование ферментов, хелатирование ионов металлов. Применение фитометаболитов как адъювантов может способствовать снижению терапевтических доз цефтазидима, уменьшая селективное давление, способствующее распространению резистентности (Keyvani-Ghamsari et al., 2023; Abdallah et.al., 2026;).

Несмотря на значительный объём исследований антибактериальных свойств растительных полифенолов, остаются недостаточно изученными молекулярные механизмы их взаимодействия с конкретными белками-мишенями - РВРЗ и β -лактамазами *P. aeruginosa* и *S. aureus* - на уровне идентификации ключевых аминокислотных остатков, типов водородных связей и количественной оценки вклада нековалентных взаимодействий в энергию связывания. Отсутствие систематического сравнительного анализа структурно-функциональных закономерностей, связыва-

ющих электронные и конформационные характеристики фитометаболитов с их аффинностью к белкам-мишеням, не позволяет обоснованно подойти к дизайну оптимальных комбинаций для комбинированной антибиотикотерапии (Sariyer et al. 2021; Masumi et al. 2022; Mazzantini et al., 2024; De Rossi et al., 2025).

Таким образом, исследование биохимических механизмов комбинированного действия цефтазидима и фенольных фитометаболитов (кверцетина, рутина, галловой кислоты) на ключевые молекулярные мишени антибиотикорезистентности - РВРЗ и β -лактамазы *P.aeruginosa* и *S.aureus* - с выявлением структурно-функциональных детерминант аддитивного эффекта является высокоактуальным, отвечает приоритетным направлениям биохимии и медицинской микробиологии и имеет как фундаментальное (раскрытие молекулярных механизмов потенцирования антибиотического действия), так и прикладное (разработка новых схем комбинированной терапии для преодоления антибиотикорезистентности) значение (Lee et al., 2025; Sati et al., 2025; Yang et al., 2026).

Цель - исследование биохимических механизмов стабилизации белок-лигандных комплексов и модуляции активности ключевых белков-мишеней: пенициллин-связывающего белка и β -лактамаз.

Задачи исследования:

1. Изучить механизм формирования межмолекулярного взаимодействия цефтазидима с кверцетином, рутином, галловой кислотой.
2. Оценить аффинность исследуемых соединений к целевым белкам (РВР и β -лактамазам) и определить вклад взаимодействий с конкретными аминокислотными остатками в стабилизацию комплексов и ингибирование активности белков.
3. Определить многомерные различия между исследуемыми веществами и выявить ключевые структурные факторы для последующего ранжирования веществ по эффективности взаимодействия с белками-мишенями.
4. Оценить бактерицидную активность комплексного применения цефтазидима с фенольными фитометаболитами в отношении *S. aureus* и *P. aeruginosa* и потенциал действия межмолекулярных комплексов путем сопоставления наблю-

даемых эффектов с данными о водородных взаимодействиях и аффинности лигандов.

Научная новизна.

Экспериментально и теоретически подтверждено формирование межмолекулярных комплексов между фенольными фитометаболитами (кверцетином, рутином, галловой кислотой) и антибиотиком цефтазидимом за счёт электростатических сил и водородных связей - без образования новых химических связей (подтверждено ИК-спектроскопией и квантово-химическим анализом).

Идентифицированы ключевые реакционноспособные центры молекул: области отрицательного электростатического потенциала локализованы в непосредственной близости от гидроксильных групп, а максимумы электронной плотности сосредоточены на атомах кислорода и азота с потенциальной делокализацией электронной плотности в пределах ароматического фрагмента.

Установлены структурные и функциональные особенности взаимодействия между белками-мишенями (РВР и β -лактамазами) и антибактериальными агентами: цефтазидимом и фенольными фитометаболитами. Выявлена критическая роль количества и локализации образованных водородных связей в стабилизации образующихся белок-лигандных комплексов, а также значимость конформационной гибкости лиганда (на примере кверцетина), обуславливающая повышение аффинности связывания. Осуществлена идентификация аминокислотных остатков (Arg, Asp, Asn, Ser, Lys, Glu), участвующих в процессе молекулярного взаимодействия.

Научно-практическая значимость.

Проведенное исследование вносит существенный вклад в развитие таких наук, как биохимия, молекулярная биология и фармацевтическая химия, поскольку позволяет углубиться в понимание механизмов антибиотикорезистентности на уровень биохимического взаимодействия антибактериальных комплексов с белковыми структурами микроорганизмов. Полученные данные позволяют расширить знания об аддитивных эффектах взаимодействия на биохимическом уровне и подготовить базу для разработки новых антибактериальных агентов и схем терапии, с

возможностью снижения токсичности известных антибактериальных препаратов и замедления развития резистентности через новые биохимические механизмы.

Преодолеть проблему антибиотикорезистентности возможно используя фенольные фитометаболиты в качестве адъювантов известных антибактериальных препаратов. Кверцетин, используемый как вспомогательное соединение для усиления антимикробного действия антибиотика цефтазидима, способствовал увеличением зоны ингибирования роста *S. aureus* ATCC 29213 и *P. aeruginosa* ATCC 27853 на 17,3% и 28,2% соответственно, а идентифицированные сайты связывания (Arg, Asp, Asn, Ser, Lys, Glu) могут служить структурной основой для рациональной разработки новых ингибиторов РВР и β -лактамаз.

Оптимизация комбинированного применения фенольных фитометаболитов предполагает ранжирование соединений по эффективности взаимодействия с белком-мишенью в следующем порядке: кверцетин > галловая кислота > рутин.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Формирование межмолекулярных комплексов цефтазидима с фенольными фитометаболитами: кверцетином, рутином и галловой кислотой осуществляется за счёт водородных связей и электростатических сил - без образования новых ковалентных взаимодействий.

2. Кверцетин проявляет высокую аффинность к РВР3 и к β -лактамазам PC1 семейства BlaZ и OXA-10 с образованием большого количества водородных связей с аминокислотными остатками Ser, Asn, Arg, Asp. Галловая кислота характеризуется низким сродством к РВР3, но проявляет высокую степень аффинности к β -лактамазам с образованием водородных связей с Asn, Arg, Glu и Lys. Рутин проявляет низкую аффинность ко всем 3 белкам - мишеням, образуя водородные связи с аминокислотными остатками Ser, Asn, Arg, Lys.

3. Основным фактором эффективности кверцетина является его конформационная гибкость, адаптация к различным конформациям белка-мишени и энтропийно выгодное комплексообразование. Галловая кислота характеризуется компактностью и плотностью донорных центров. Особенностью рутина является его стерическая загруженность. Ранжирование по эффективности взаимодействия

фенольных фитометаболитов с белками мишенями: кверцетин> галловая кислота> рутин.

4. При комплексном действии кверцетина с цефтазидимом установлен выраженный аддитивный бактерицидный эффект, зона ингибирования роста *S. aureus* ATCC 29213 возрјсла на 17,3 % и на 28,2 % у *P. aeruginosa* ATCC 27853, что соотносится с рассчитанным улучшением термодинамических показателей ΔG на 0,56 ккал/моль и снижением K_i в 2,6 раза. Для рутина характерен антагонизм в комбинации с цефтазидимом, как в отношении *S. aureus* ATCC 29213 (зоны ингибирования отсутствуют, ΔG возрастает на 3,12 ккал/моль, K_i увеличивается в 192 раза), так и в действии на *P. aeruginosa* ATCC 27853. У галловой кислоты в отношении *S. aureus* ATCC 29213 выявлено увеличение зоны ингибирования роста на 8 % (при 0,1 г/л) с последующим ослаблением эффекта при разведении. В отношении *P. aeruginosa* ATCC 27853 ингибирующее действие возрастает на 11-84 % в диапазоне 0,1-0,002 г/л, с усилением эффекта при снижении концентрации.

Внедрение результатов исследования.

Результаты исследования используются в учебном процессе в ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации на кафедре фармацевтической химии в рамках изучения студентами фармацевтического факультета дисциплин «Биологическая химия» и «Применение нанотехнологий в создании новых лекарственных препаратов» (акт внедрения от 17.09.2026 г., Приложение Б).

Личное участие автора.

Личный вклад соискателя охватывает полный цикл исследовательской работы: проведён комплексный анализ отечественной и зарубежной научной литературы по тематике исследования; совместно с научным руководителем разработан план эксперимента; самостоятельно выполнены экспериментальная и аналитическая части работы. На основании полученных данных проведён детальный анализ результатов, их сопоставление с актуальными научными представлениями и формулирование обоснованных выводов.

Апробация работы.

Материалы диссертации представлены на конференциях различного уровня: «Теория и практика инновационных исследований в области естественных наук» Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, Оренбург, 21-22 апреля 2022 года; «Фундаментальные исследования в области химии, биологии и экологии» Международная студенческая научно-практическая конференция, Оренбург, 24-25 октября 2022 г.; «Университетский комплекс как региональный центр образования, науки и культуры» Всероссийская научно-методическая конференция, Оренбург, 26-27 января 2023 г.; «Теория и практика инновационных исследований в области естественных наук» II Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, Оренбург, 26-27 апреля 2023 г.; «Проблемы экологии Южного Урала» XI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 25-летию кафедры биохимии и микробиологии, Оренбург, 04-05 октября 2023 г.; «Биоинформатика регуляции и структуры геномов / системная биология» Четырнадцатая международная мультikonференция, Новосибирск, 05-10 августа 2024г.; «Университетский комплекс как региональный центр образования, науки и культуры» Всероссийская научно-методическая конференция, Оренбург, 01-03 февраля 2024г.; «Теория и практика инновационных исследований в области естественных наук» Конференции, Оренбург, 24-25 апреля 2024 г.; «Проблемы теории и практики современной науки» Международная (заочная) научно-практическая конференция, Нефтекамск, 19 ноября 2024г.; «Университетский комплекс как региональный центр образования, науки и культуры» Всероссийская научно-методическая конференция, посвященная 70-летию Оренбургского государственного университета, Оренбург, 30 января - 01 февраля 2025г.; «Наука и образование: фундаментальные основы, технологии, инновации» Всероссийская научно-методическая конференция, посвященная 70-летию Оренбургского государственного университета, Оренбург, 17-20 сентября 2025г.; «Проблемы экологии Южного Урала XII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, Оренбург, 06-07 ноября 2025 г.; «Fundamental science innovation and technology» VIII Международная научно-практическая конференции, Уфа, 10 октября 2025г.; «Университетский

комплекс как региональный центр образования, науки и культуры» Всероссийская научно-методическая конференция, Оренбург, 29-31 января 2026г.; «Искусственный интеллект в образовании» Международная научно-практическая конференция, Оренбург, 26-27 января 2026г.; «Теория и практика инновационных исследований в области естественных наук» V Всероссийская научно-практическая конференции, посвященная 20-летию образования химико-биологического факультета, Оренбург, 28-29 апреля 2026 г.

Публикация результатов исследования.

По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации материалов диссертационных работ на соискание ученой степени кандидата биологических наук, 16 тезисов в сборниках материалов конференций, 1 база данных - Свидетельство № 2026620726, 1 патент на изобретение RU 2839893 C1.

Структура и объем диссертации.

Работа изложена на 185 страницах машинописного текста. Включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждение, заключение, выводы, список литературы, включающий 181 публикацию. Диссертация иллюстрирована 58 рисунками, включает 23 таблицы и дополнена приложением.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Роль биохимической модификации β -лактамных антибиотиков в современной антибактериальной терапии

В контексте глобальной проблемы антибиотикорезистентности перспективным стратегическим направлением является разработка антибактериальных комплексов на основе биохимической модификации традиционных противомикробных агентов с использованием вторичных метаболитов растительного происхождения. Экспериментально подтверждено, что рациональное комбинирование данных биологически активных соединений способно:

- 1) оптимизировать фармакодинамические параметры взаимодействия антибиотика с бактериальной мишенью;
- 2) индуцировать альтернативные механизмы антимикробного воздействия;
- 3) потенцировать антимикробную активность при снижении эффективной дозы основного агента.

Таким образом, данный подход позволяет достичь трёх ключевых целей: расширить спектр антимикробного действия, замедлить эволюцию резистентности и минимизировать токсикологические риски за счёт снижения рабочих концентраций антибактериальных компонентов.

Согласно современным данным (Klein et al., 2018; Egorov et al., 2020; Alfei et al., 2022; Turner et al., 2022; Kim et al., 2023; Pandey et al., 2025), β -лактамные антибиотики (β -лактамы) остаются одним из наиболее эффективных классов антибактериальных средств. Их фармакологическое действие обусловлено специфическим взаимодействием с пенициллин-связывающими белками (PBP) - транспептидазами, участвующими в биосинтезе пептидогликана клеточной стенки.

Молекулярный механизм действия заключается в следующем:

- 1) β -лактамное кольцо структурно имитирует D-Ala-D-Ala-субстрат PBP;
- 2) происходит ковалентное связывание (ацилирование) β -лактама с гидроксильной группой серина в активном центре PBP;

3) это приводит к необратимому ингибированию фермента и нарушению поперечной сшивки пептидогликановых цепей, что вызывает лизис растущей бактериальной клетки.

Существенно, что β -лактамазы - ферменты, обеспечивающие устойчивость бактерий к β -лактамам, - также содержат каталитический Ser в активном центре и образуют аналогичный ацил-ферментный интермедиат при взаимодействии с β -лактамным кольцом. Данное структурно-функциональное сходство между РВР и β -лактамазами подчёркивает эволюционную связь между мишенью действия и ферментом резистентности.

β -лактамы подразделяются на четыре основные группы, применяемые в терапевтической практике. Структурно они классифицируются следующим образом: три группы характеризуются бициклическим строением молекулы - пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы, - в то время как четвёртая группа, представленная монобактамами, обладает моноциклической структурой (рисунок 1.1).

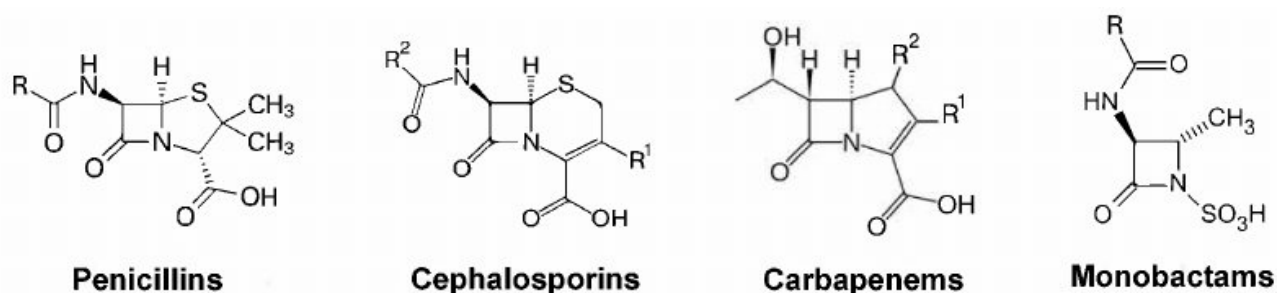


Рисунок 1.1 - Строение основных групп β -лактамных антибиотиков.

Структурная организация β -лактамных антибиотиков характеризуется наличием четырёхчленного 2-азетидинового кольца (β -лактамного кольца), которое конденсировано с различным гетероциклическим фрагментом в зависимости от подкласса соединений: с тиазолидиновым кольцом - в случае пенициллинов; с шестичленным дигидротиразином - в случае цефалоспоринов; с пятичленным пирролином - в случае карбапенемов.

Интенсивные программы химической модификации природных β -лактамных структур, выделенных в каждой из указанных групп, привели к созданию об-

широкого ряда полусинтетических производных. Современные направления исследований нацелены на оптимизацию фармакокинетических параметров, повышение антибактериальной эффективности и безопасности, расширение спектра антимикробной активности, а также преодоление специфических механизмов резистентности, развивающихся у целевых видов бактерий (Tooke et al., 2019; Egorov et al., 2020; Venuti et al., 2023).

Цефалоспорины представляют собой класс β -лактамов антибиотиков, широко применяемых в клинической практике для терапии инфекционных заболеваний различной степени тяжести - от лёгких до тяжёлых форм. Полусинтетические производные данной группы характеризуются расширенным спектром антимикробной активности, охватывающим как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии.

Молекулярная структура цефалоспоринов основана на бициклическом ядре, включающем шестичленное дигидротиазиновое кольцо, конденсированное с β -лактамовым кольцом. Ключевые позиции цефалоспоринового каркаса - атомы углерода C3 и C7 - предоставляют широкие возможности для химической модификации посредством введения переменных боковых цепей. Такая структурная оптимизация позволяет:

- 1) существенно продлить период антибактериальной активности;
- 2) повысить устойчивость молекулы к гидролизу β -лактамазами;
- 3) улучшить фармакокинетические и фармакодинамические параметры препарата. Данные аспекты подробно рассмотрены в современных исследованиях (Lin et al., 2022; Madhane et al., 2025; Грацианская и др., 2026).

1.2 Механизм и особенности синтеза пептидогликана

Пептидогликан (peptidoglycan) - ключевой структурный компонент клеточной стенки бактерий. Он формирует жёсткий сетчатый каркас вокруг цитоплазматической мембраны. Будучи первоначальной мишенью β -лактамовых антибиотиков, пептидогликан остаётся объектом интенсивного изучения в контексте фундаментальной микробиологии, поиска новых антимикробных мишеней и исследования механизмов патогенеза (Garde et al., 2021).

Синтез пептидогликана критически важен на различных этапах бактериального клеточного цикла:

1) при удлинении клетки - для расширения каркаса клеточной стенки и размещения растущего цитозольного содержимого в условиях доступности питательных веществ;

2) при делении клетки - для локализованного синтеза в средней части клетки, формирования септальной перегородки и последующего образования дочерних клеток (Turas et al., 2011).

Прочная трёхмерная структура пептидогликанового слоя обеспечивает защиту клетки от осмотического давления (тургора); поддержание морфологии и формы бактериальной клетки; механическую стабильность клеточной стенки.

1.2.1 Этапы биосинтеза пептидогликана

Биосинтез пептидогликана представляет собой многостадийный процесс, охватывающий три субклеточных компартмента: цитоплазму, внутреннюю мембрану и периплазму (рисунок 1.2, 1.3). Он включает следующие последовательные этапы:

1) Цитоплазматический этап: синтез нуклеотид-активированных предшественников - в т.ч. UDP-N-ацетилглюкозамина (UDP-GlcNAc) и DP-N-ацетилмуравовой кислоты (UDP-MurNAc), а также пептидных цепочек (обычно из 4-5 аминокислот).

2) Мембранный этап: сборка липид-связанных мономерных предшественников (липид-I и липид-II) на цитоплазматической поверхности внутренней мембраны.

3) Транслокация: перенос липид-II через внутреннюю мембрану в периплазму с участием специфических переносчиков (например, бактериопренола).

4) Периплазматический этап: полимеризация мономерных единиц в гликановые цепи (транзгликозилирование); ферментативное сшивание пептидных боковых цепей (транспептидация) с участием РВР, формирующих трёхмерную сеть; образование функционального пептидогликанового слоя.

5) Созревание и ремоделирование: постсинтетические модификации (О-ацетилирование, N-деацетилирование и др.) и динамическое ремоделирование структуры в ходе роста и деления клетки.

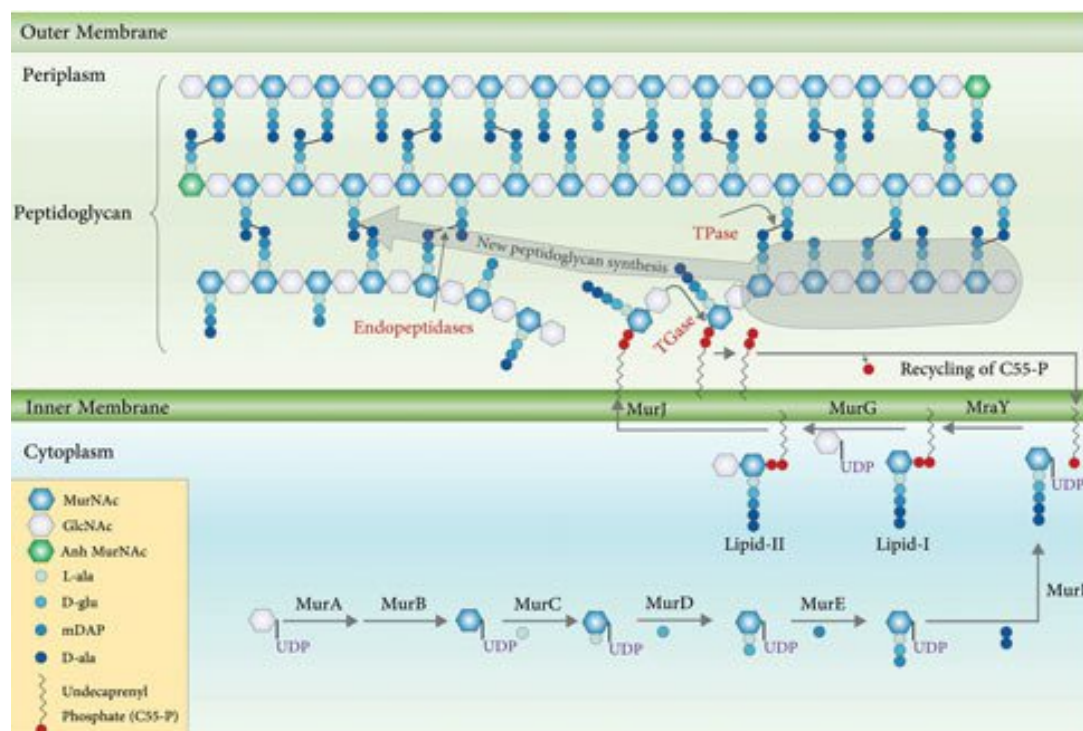


Рисунок 1.2 - Путь биосинтеза пептидогликана

Успешная сборка пептидогликанового слоя требует точной пространственно-временной координации всех этапов биосинтеза. Нарушение любого из них может привести к дефектам клеточной стенки, лизису клетки и гибели бактерии.

Столетие исследований позволило раскрыть фундаментальные аспекты биологии пептидогликана. Современные методы молекулярной биологии, структурной биологии и биохимии (крио-электронная микроскопия, флуоресцентная микроскопия, протеомика) существенно расширили понимание молекулярных механизмов, регулирующих синтез и ремоделирование пептидогликана (Garde et al., 2021; Typas et al., 2011).

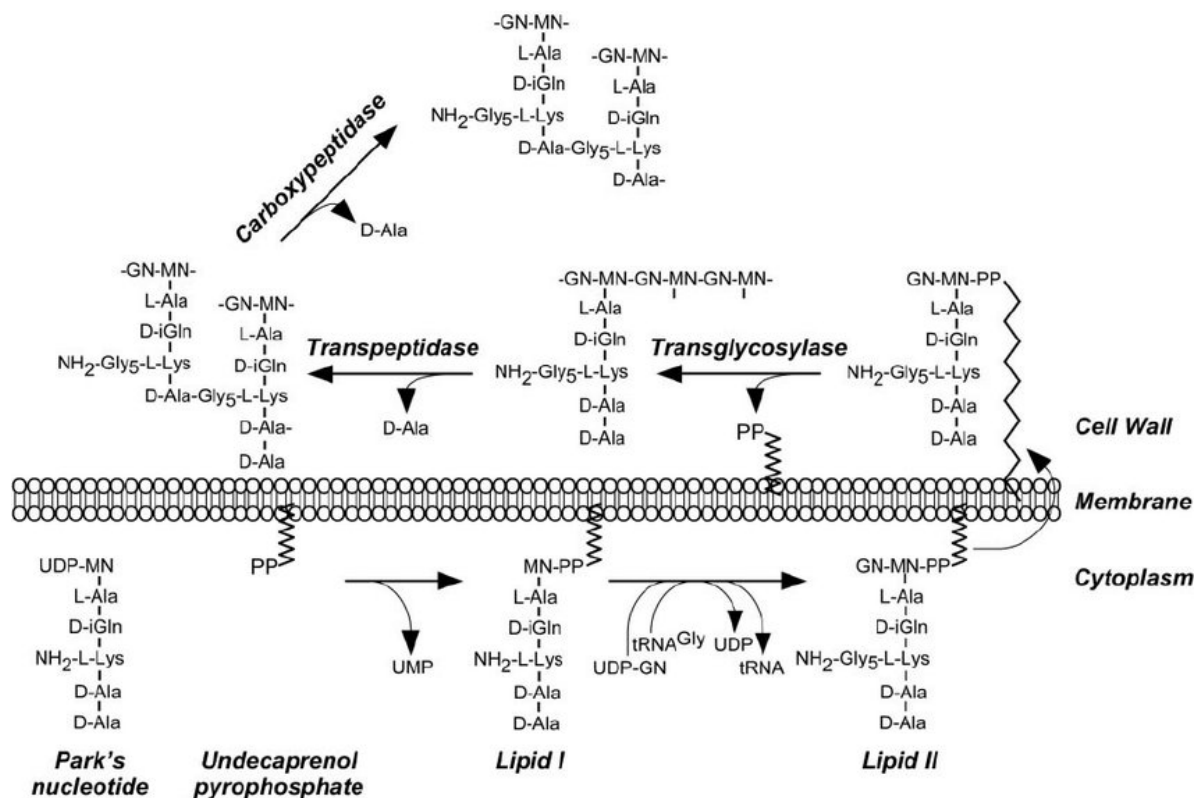


Рисунок 1.3 - Синтез пептидогликана у *S. aureus*

Биосинтез предшественников пептидогликана протекает в цитоплазме и катализируется последовательным действием ферментов семейства Mur (MurA-F). На этом этапе UDP-N-ацетилглюкозамин (UDP-GlcNAc) преобразуется в UDP-N-ацетилмурамоил-пентапептид (UDP-MurNAc-пентапептид), также известный как «нуклеотид Парка» (van Heijenoort J., 2011).

1.2.2 Этапы формирования липид-связанных предшественников

На первом этапе идёт присоединение к липидному носителю. Осуществляется катализ ферментом MraY переноса UDP-MurNAc-пентапептида на липидный транспортер – ундекапренилфосфат, с последующим образованием липида-I (Breukink et.al., 2006; Lovering et al., 2007).

Второй этап – образование липида II. Осуществляется присоединение остатка N-ацетилглюкозамина к липиду-I ферментом MurG, с формированием конечного предшественника пептидогликана – липида – II (Uehara et al., 2005).

Третий этап – транслокация через мембрану. Происходит транспортировка липида – II через внутреннюю мембрану в периплазму посредством флиппазы MurJ. Этот этап важен для доставки мономерных предшественников к месту сборки пептидогликана (Sham et al. 2014; Ruiz et al., 2010).

На четвёртом этапе осуществляется рециклинг липидного носителя. Ундекапренилфосфат возвращается в цитоплазму после отщепления мономерного предшественника и повторно используется в биосинтезе молекул липида-II (El Ghachi et al., 2005).

1.2.3 Полимеризация и сшивка пептидогликановых цепей

Полимеризация и сшивание липида – II осуществляется в периплазме. Идёт образование зрелой структуры пептидогликана, включающей два ферментативных механизма:

1) Процесс трансликозилирования (ТГазная активность), который катализируется ферментами RodA, FtsW, PBP1a, PBP1b и MtgA, обеспечивающими полимеризацию гликановых цепей за счёт образования β - (1,4) -гликозидных связей между остатками N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты (Meeske et al., 2016; Cho et al., 2014).

2) Процесс транспептидации (ТПазная активность), который осуществляется пенициллин-связывающими белками PBP2, PBP3, PBP1a и PBP1b.

Они являются катализаторами образования пептидных поперечных связей между боковыми пептидными цепочками соседних гликановых нитей, образуя трёхмерную сеть пептидогликана (Sauvage et al., 2008; Tiras et al., 2010).

Для роста, деления и поддержания морфологии клетки необходимо постоянное ремоделирование пептидогликана. Этот процесс регулируют *d*, *d*-эндопептидазы (MerS, MerM, MerH), которые осуществляют гидролиз существующих пептидных поперечных связей, с последующим освобождением пространства для новых гликановых цепей, а также обеспечивают пластичность клеточной стенки в ходе клеточного цикла (Vollmer et.al., 2010).

Остаток ангидро-N-ацетилмурамовой кислоты (anh-MurNAc) является конечным структурным элементом в гликановой цепи, маркирующим терминальный участок растущей цепи. Направление синтеза пептидогликанового слоя соответствует вектору роста клетки и определяется локализацией и активностью ключевых биосинтетических комплексов (например, комплекса деления FtsZ и удлинительного комплекса RodA-MreB).

1.2.4 Роль PBP в биосинтезе пептидогликана

На рисунке 1.4 представлен обзор роли PBP в биосинтезе пептидогликана.

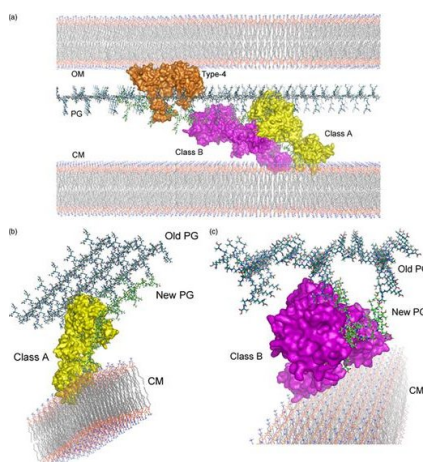


Рисунок 1.4 - Роль PBP в биосинтезе пептидогликана. (а) Обзор синтеза гликановой цепи и ее включения в старый пептидогликан. Ранее существовавший пептидогликан показан синим цветом. Вновь синтезированная гликановая цепь пока-

зана зеленым цветом. Гликановая цепь удлиняется за счет включения липида II в гликозилтрансферазный домен класса A PBP (желтый). Транспептидация между гликановой цепью и старым пептидогликан происходит как в транспептидазном домене класса A PBP, так и в транспептидазном домене класса B PBP (пурпурный). Новая цепь включается после эндопептидации ранее существовавшего пептидогликана PBP типа 4 (оранжевый). (b) Удлиняющаяся гликановая цепь, проходящая вдоль поверхности PBP класса A, и ее прикрепление к ранее существовавшему пептидогликану. (c) Транспептидация PB домена класса B гликановой цепи. Новая гликановая цепь (зеленого цвета), ранее подключенная к старому пептидогликану с помощью PBP класса A, транспептируется PBP класса B.

Липид II - ключевой промежуточный предшественник пептидогликана - проходит последовательные этапы биосинтеза и модификации, обеспечивающие его интеграцию в структуру клеточной стенки.

1.2.5 Этапы биосинтеза липида II

1) Синтез в цитоплазме. Образование липида II инициируется действием ферментов семейства Mur (MurA-F), которые катализируют последовательные реакции превращения UDP-N-ацетилглюкозамина (UDP-GlcNAc) в UDP-N-ацетилмурамоил-пентапептид (UDP-MurNAc-пентапептид) и его последующее присоединение к липидному носителю - ундекапренилфосфату ($C_{55}P$) (Barreteau et al., 2008).

2) Модификация в мембране. На этапе встраивания в мембрану липид II подвергается дальнейшим модификациям, обеспечивающим его готовность к транслокации и последующей полимеризации (Bouhss et al., 2007).

3) Транслокация в периплазму. С помощью флиппазы MurJ липид II транспортируется через внутреннюю мембрану в периплазму, где становится доступным для биосинтетических комплексов клеточной стенки.

4) Интеграция в пептидогликановый слой. Липид II доставляется в активный центр гликозилтрансферазы (ГТ), ассоциированной с PBP класса A. Здесь проис-

ходит его трангликозилирование - включение в растущую гликановую цепь, которая может перемещаться вдоль поверхности РВР класса А (рисунок 1.4(a)) (Meroueh et al., 2006).

1.2.6 Пространственная организация трангликозилирования

В процессе удлинения гликановой цепи донорная цепь может обладать трёх- или четырёхкратной осью вращения при движении вдоль поверхности РВР класса А (Meroueh et al., 2006). Это обеспечивает: гибкость пространственной организации ферментативного комплекса; возможность точного позиционирования субстрата относительно каталитических доменов; эффективную полимеризацию гликановых цепей за счёт последовательного присоединения мономерных единиц липида II.

1.2.7 Транспептидация и интеграция новой цепи

Стволовой пептид пентапептида дисахаридного звена растущей цепи (в составе примерно девяти дисахаридных единиц, ассоциированных с активным центром гликозилтрансферазы) встраивается в бороздку активного центра транспептидазного домена РВР. В этой позиции он становится мишенью для транспептидазной атаки со стороны ранее сформированного пептидогликанового слоя (рисунок 1.4 (b)).

Ключевые этапы: позиционирование стволового пептида в активном центре; образование пептидной поперечной связи между боковой цепью растущей гликановой цепи и аминок группой пептида в зрелом пептидогликане; формирование трёхмерной сети пептидогликана, обеспечивающей механическую прочность клеточной стенки.

1.2.8 Структурно-функциональная роль РВР класса А

Ориентация активного центра транспептидазного домена в составе РВР класса А позволяет предположить, что эти ферменты выполняют двойную функцию: трангликозилирование (полимеризация гликановых цепей); начальная транспептидация (образование пептидных сшивок).

Кроме того, пространственная организация РВР класса А обеспечивает возможность «зацепления» удлиняющейся гликановой цепи под слоем ранее сформированного пептидогликана. Это критически важно для: координированного роста клеточной стенки; поддержания её целостности в ходе клеточного цикла; обеспечения равномерного распределения механических напряжений в структуре пептидогликана.

Несмотря на то, что РВР класса А имеют транспептидазный домен, необходим транспептидазный домен РВР класса В. Точная роль каждого транспептидазного домена в биосинтезе пептидогликана неизвестна, и предполагается, что РВР класса В предпринимают перекрестное сшивание гликановой цепи, зацепленной РВР класса А под старым пептидогликаном, со второй цепью пептидогликана (рисунок 1.4 (с)). После гидролиза эндопептидазой связи, которая сшивает две старые гликановые цепи, новая цепь достигает поверхности в результате внутреннего давления. Эндопептидазная активность РВР типа 4 или -7 может служить для расщепления поперечных связей между гликановыми цепями (рисунок 1.5). Эти ферменты не обязательно должны быть напрямую связаны с элонгазным комплексом, но они могут быть связаны с другими амидазами. Более того, эти амидазы могут разрушать пептид, который сшивает старые нити в разных местах, делая РВР типа 4 и типа 7 незаменимыми ферментами.

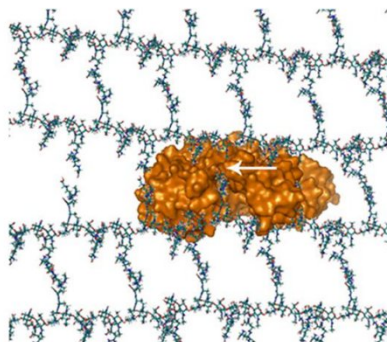


Рисунок 1.5 - Эндопептидация РВР типа 4. Вид на пептидогликан со стороны цитоплазматической мембраны. РВР типа 4 (оранжевый) может гидролизовать поперечную связь между двумя гликановыми цепями. Активный участок обозначен белой стрелкой.

1.2.9 Механизм действия β -лактамов на пептидогликан

Механизм антибактериального действия β -лактамов основан на нарушении процесса сшивки пептидогликана - основного полимера бактериальной клеточной стенки. Важно отметить, что пептидогликан не является статической структурой: он динамически ремоделируется в соответствии с ростом бактериальной клетки и подвергается контролируемой деструкции в зоне септальной перегородки в ходе клеточного деления, что обеспечивает разделение материнской и дочерних клеток (Shaevitz, 2018).

Поддержание целостности клеточной стенки при сохранении внутреннего тургорного давления представляет собой сложную биологическую задачу. Осуществляют поддержание целостности специализированные ферментные системы. Гликозилтрансферазы обеспечивают удлинение гликановых цепей, транспептидазы являются катализаторами образования пептидных сшивок между боковыми цепями гликанов в процессе полимеризации, а амидазы, карбоксипептидазы, эндопептидазы и гликозилазы являются регуляторами степени сшивки пептидогликанового слоя, контролируя длину гликановых цепей и обеспечивая разделение дочерних клеток после деления (Vermassen et al., 2019).

Постоянное ремоделирование пептидогликана обеспечивает не только рост и деление клетки, но и поддержание механической жёсткости (Trivedi et al., 2018) и морфологии бактериальной клетки (Cassamo et al., 2018). Поэтому любые агенты, способные вмешиваться в процесс биосинтеза, сшивки и ремоделирования пептидогликана обладают потенциальным антибактериальным эффектом.

РВР – это семейство периплазматических ферментов бактериальной клетки, являющееся мишенями действия β -лактамных антибиотиков. Они обладают

значительной функциональной гетерогенностью, включающей такие ферменты, как транспептидазы, карбоксипептидазы и эндопептидазы с различной субстратной специфичностью. Однако все они характеризуются консервативной организацией активного центра, который включает остаток Lys, формирующего основание активного центра и сериновый нуклеофил, участвующий в каталитическом механизме. Поэтому название «РВР» является общим для всех членов семейства данных белков, независимо от их специфической ферментативной активности (Caveney et al., 2018).

Каждый вид бактериальных клеток обладает своим набором РВР. *Staphylococcus aureus* экспрессирует четыре РВР; *Escherichia coli* выделяет двенадцать РВР (Sauvage et al., 2008) и т.д. Таким образом бактерии адаптируются к специфическим условиям биосинтеза и ремоделирования пептидогликана.

Выделяют высокомолекулярные (НММ) и низкомолекулярные (ЛММ) РВР.

Основные задачи НММ РВР это катализ полимеризации гликановых цепей (гликозилтрансферазная активность) и обеспечение интеграции новообразованных участков пептидогликана в уже существующую структуру клеточной стенки.

Нумерация РВР исторически основана на результатах электрофоретического разделения белков методом додецилсульфат-натриевого полиакриламидного гелевого электрофореза. Однако такой подход имеет ограничения и может приводить к неточностям в номенклатуре, поскольку: порядок миграции белков в геле зависит от их молекулярной массы и конформационных особенностей; гомологичные белки у разных видов бактерий могут иметь различную электрофоретическую подвижность; функциональная гомология не всегда коррелирует с порядковым номером РВР.

Примеры межвидовой гомологии иллюстрируют эту проблему:

- 1) РВР2 *S. aureus* относится к классу А и функционально и структурно близок к РВР1а *E. coli*;
- 2) РВР3 *S. aureus* демонстрирует сходство с РВР2 *E. coli*;
- 3) РВР1 *S. aureus* гомологичен РВР3 *E. coli*.

Бактерии используют несколько стратегий для преодоления действия β -лактамовых антибиотиков:

- 1) эффлюкс - активный отток антибиотика из периплазмы;
- 2) модификация мишени - мутации РВР или экспрессия β -лактамно-устойчивых вариантов этих белков;
- 3) формирование толерантных состояний (например, персистирующих клеток), повышающих устойчивость к антибиотикам (Balaban et al., 2019);
- 4) ферментативная деградация - экспрессия β -лактамаз, гидролизующих β -лактамовое кольцо антибиотика. Эти ферменты эволюционно связаны с РВР и сохраняют структурное сходство с их лизин-сериновым активным центром (Massova et al., 1998).

Непрерывный процесс трансформации восприимчивых бактериальных штаммов в резистентные требует регулярной оптимизации клинической структуры β -лактамовых антибиотиков. Ранее предполагалось, что бактерицидный эффект β -лактамов обусловлен прямой потерей функции РВР. В настоящее время установлено, что инактивация РВР под действием β -лактамов выступает в роли триггерного события, запускающего сложные, потенциально видоспецифичные биохимические пути, завершающиеся бактерицидным лизисом бактериальной клетки (Wong et al., 2019).

Все РВР обладают общей dd-пептидазной активностью, которая реализуется через следующие функциональные подтипы:

- 1) dd-транспептидазы;
- 2) dd-карбоксипептидазы;
- 3) dd-эндопептидазы (Goffin et al., 1998).

Эти ферменты играют ключевую роль в биосинтезе и ремоделировании пептидогликана, катализируя реакции карбоксипептидации и транспептидации по трёхступенчатому механизму:

- 1) Образование нековалентного комплекса Генри-Михаэлиса. На первом этапе происходит быстрое и обратимое связывание фермента с пептидогликановым

стеблевым пентапептидом (донорской цепью) с последовательностью L-Ala- γ -D-Glu-A 2 pm (или L-Lys) -D-Ala-D-Ala.

2) Ацилирование. Активный остаток Ser в каталитическом центре PBP атакует карбонильный атом углерода С-концевого остатка D-Ala-D-Ala. В результате: формируется промежуточный ацил-ферментный комплекс; высвобождается С-концевой остаток D-Ala.

3) Деацилирование. Заключительная стадия может протекать по двум альтернативным путям: гидролиз с высвобождением укороченного пептида (реакция карбоксипептидации); образование поперечных связей с акцепторной цепью - вторым пептидом пептидогликанового ствола (реакция транспептидации).

Dd-эндопептидазная активность PBP заключается в гидролизе поперечных пептидных сшивок, сформированных ранее в результате действия dd-транспептидаз. Этот процесс необходим для: локального ремоделирования пептидогликанового слоя; обеспечения пластичности клеточной стенки в ходе роста и деления клетки; контролируемого разрушения старых сшивок перед встраиванием новых гликановых цепей (Sauvage et al., 2008).

Dd-пептидазная активность PBP катализируется консервативным PBD, который также служит мишенью для β -лактамных антибиотиков. Механизм ингибирования основан на структурном сходстве между β -лактамным кольцом антибиотика (в т. ч. пенициллина) и дипептидом D-Ala-D-Ala - концевым фрагментом естественного субстрата PBP.

Структурная информация о взаимодействии PBP с субстратами в основном получена из анализа комплексов низкомолекулярных PBP (LMM) с синтетическими субстратами, имитирующими природные.

Боронильная группа, входящая в состав таких аналогов, осуществляет имитацию переходного состояния реакции деацилирования, которую катализирует PBP (Nicola G. et al., 2005). Например, структура комплекса PBP4a *B. subtilis* с пептидом α -аминопимелил- ϵ -D-аланил-D-аланином, который имитирует завершающий трипептид пептидогликана (Sauvage E. et al., 2007). Комплекс включает ацил-фермент (α -аминопимелил- ϵ -D-аланил-PBP4a) и свободный D-аланин - продукт реакции

ацилирования. Конформация предпоследнего D-аланина пептида доносочного ствола

плотно прилегает к активному центру РВР. При этом его амидная группа зажата между боковой цепью Asn второго мотива и остовом β 3-цепи, а карбонильный кислород находится в оксианионном отверстии. Отмечено встраивание метильной группы в гидрофобный карман (важную роль здесь играет консервативный глицин в задней части центра), а карбоксилат уходящего D-аланина ориентирован на две гидроксильные группы третьего мотива.

Среди девяти консервативных остатков активного центра особенно важны:

- 1) Asn второго мотива;
- 2) гидроксильные группы третьего мотива - для позиционирования субстрата;
- 3) Gly третьего мотива - предотвращает стерические препятствия;
- 4) Gly в задней части центра - обеспечивает специфичность связывания с предпоследним D-аланином (Adediran et al., 2005) (рисунок 13 b).

Ацилирование РВР предпоследним D-аланином донорской цепи и одновременное высвобождение последнего D-аланина требуют абстракции протона из активного серина.

Возможный механизм: лизин первого мотива (в депротонированной форме) отщепляет протон от активного Ser и протон передаётся к аминогруппе уходящего D-аланина через серин второго мотива (Sauvage et al., 2007). Альтернатива - одностадийный перенос протона: от активного Ser к Ser второго мотива, далее - от Ser второго мотива к аминной группе уходящего D-аланина (Dive G. et al., 1999).

На стадии деацилирования протон акцепторной группы (аминогруппы при транспептидировании или воды при карбоксипептидировании) должен быть абстрагирован для атаки активированной группы на карбонильный атом углерода ацил-фермента (Goffin et al., 1998). Затем протон возвращается активному серину.

Абстракция протона может осуществляться лизином третьего мотива (в депротонированной форме) (Nicola G. et al., 2005) и Ser второго мотива при участии лизина третьего мотива.

В dd-пептидазе *Streptomyces* R61 аналогичную функцию выполняет Tyr второго мотива: его гидроксильная группа в активном центре участвует в деацилировании, как гидроксильная группа Ser в мотиве SxN других PBP (Silvaggi N.R. et al., 2003).

Активный центр PBP функционирует как двойная Lys-Ser система, обеспечивающая процессы ацилирования и деацилирования, которые взаимосвязаны и не являются независимыми.

Каталитические диады Lys-Ser часто встречаются в ферментах (Lee J. et al., 2007), но упрощённое представление о переносе протона от Ser к Lys может быть неточным. Протон занимает промежуточное положение между атомом кислорода Ser и атомом азота Lys, а ориентация неподелённых пар кислорода критически важна для катализа.

Квантово-химические расчёты для Lys-Ser диад могут дать ценные сведения о механизмах ацилирования и деацилирования PBP (Sauvage et al., 2008).

1.2.10 Взаимодействие PBP с β -лактамами

PBP различаются по чувствительности к β -лактамным антибиотикам, образуя с ними стабильный ацил-фермент. Кристаллографические исследования позволили зафиксировать эти комплексы. Большинство структур PBP определены в апо-форме и в комплексе с β -лактамами (Kishida et al., 2006; Hunashal et al., 2023; Dabhi et al. 2024; Moyo et al., 2026).

Рентгеновские структуры показывают, что ковалентно связанные с Ser активного центра антибиотика принимают сходную конформацию, схожую с ацил-ферментом PBP4a- α -аминопимелил- ϵ -D-аланином:

- 1) амидная группа боковой цепи расположена между аспарагином второго мотива и β 3-цепью;
- 2) карбоксилат антибиотика связан водородными связями с гидроксильными группами мотива KTGT;
- 3) карбонильный кислород находится в оксианионном отверстии.

Ацил-фермент РВР2а-бензилпенициллин - типичный пример такой «канонической» конформации (Lim et al., 2002). Каталитический механизм может следовать схеме для РВР с D-Ala-D-Ala стеблевым пентапептидом, но возможны и альтернативные варианты.

РВР класса А у *S. aureus* последовательно локализируются в клеточной перегородке.

Штаммы *S. aureus*, чувствительные к β -лактамам, имеют два РВР класса В (Pereira et al., 2007), тогда как устойчивые штаммы дополнительно экспрессируют РВР2а с низкой чувствительностью к этим антибиотикам (Zapun et al., 2008).

РВР4 *S. aureus* обладает транспептидазной активностью, необходимой для высокой степени сшивки пептидогликана стафилококков (Wyke et al., 1981; Sacco et al., 2024; Ledger et al., 2024).

Активация механизмов резистентности у *S. aureus* происходит только после обнаружения β -лактамных антибиотиков.

1.3 Индуцированные конформационные изменения РВР3 в комплексе с цефтазидимом

Антисинегнойный цефалоспорин цефтазидим преимущественно связывается с РВР3, вызывая образование бактериальных филаментов (Han et al., 2010; Smith et al., 2024; Glen et al., 2024).

Кристаллическая структура комплекса РаРВР3-цефтазидим (разрешение 1,74 Å) показывает:

- 1) ковалентное связывание цефтазидима с Ser294;
- 2) перегруппировку дигидротиазинового кольца с образованием экзоциклической метиленовой группы в положении С3 (из-за отщепления пиридинового фрагмента);

3) расположение карбонильного кислорода в оксианионной дыре с водородными связями с амидами Ser294 и Thr487;

4) закрепление карбоксильной группы C4 двумя водородными связями с Ser485 и Thr487 (мотив KSGT);

5) переориентацию Lys297 (мотив SXXK) для взаимодействия с остатками Ser349 и Asn351 мотива SXN (рис. 15(A)) (Faraci et al., 1986).

Аминотиазоловая группа цефтазидима активно взаимодействует с РВР3 *P. aeruginosa*:

1) амидная связь зажата между карбонильным остовом Thr487 и боковой цепью Asn351;

2) аминотиазол стабилизируется водородными связями с Glu291 и Arg489, а также гидрофобным контактом с Tyr409.

При связывании цефтазидима боковая цепь Tyr409 отклоняется от сайта связывания, избегая стерических столкновений. Этот остаток консервативен для высокомолекулярных РВР подкласса В3 других грамотрицательных бактерий (*N. gonorrhoeae*, *E. coli*), где наблюдаются аналогичные конформационные изменения (Powell et al., 2009).

Для β -лактамаз и низкомолекулярных РВР характерны иные механизмы: аминотиазольная группа образует меньше прямых взаимодействий и принимает разные конформации в сайте связывания (Kuzin et al., 1995; et al., 2001), что указывает на вариабельность стратегий узнавания (рисунок 1.6).

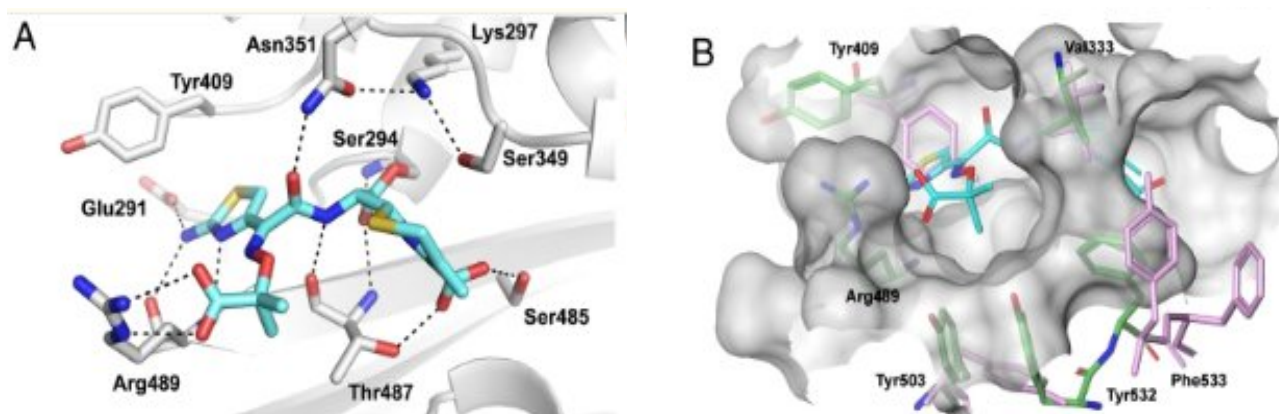


Рисунок 1.6 - Взаимодействие цефтазидима, имипенема и меропенема в активном центре РВР3 *P. aeruginosa*. (А) Активный центр в структуре цефтазидим-

ацила РВРЗ *P. aeruginosa*. Цефтазидим показан в виде палочек с голубыми углеродами и водородными связями в виде тире. (В) Молекулярная поверхность РВРЗ *P. aeruginosa* в области активного центра в комплексе с цефтазидимом (цианом). Структура apo РаРВРЗ показана розовым цветом.

При связывании цефтазидима: остатки Tyr532 и Phe533 принимают новую конформацию, смещая Tyr503 к активному центру; формируется ароматическая стенка (Tyr503, Tyr532, Phe533), вмещающая гем-диметиловую группу антибиотика за счёт гидрофобных взаимодействий; Val333 смещается на $\sim 1,5$ Å, взаимодействуя с гем-диметиловой группой и обеспечивая ван-дер-ваальсовы контакты с дигидротиазинным кольцом (рисунок 1.7(В)); карбоксильная группа антибиотика образует солевой мостик с Arg489.

Эти структурные элементы (Tyr503-Tyr532-Phe533, Val333, Arg489) способствуют эффективному ингибированию РВРЗ *P. aeruginosa*.

1.4 Выработка β -лактамаз и изменения РВР, как механизмы резистентности к цефалоспорином

Существуют три основных механизма, вызывающих устойчивость к антибиотикам цефалоспоринового ряда (Lin et al., 2022; Madhane et al., 2025).

1. Одним из наиболее распространённых и клинически значимых механизмов антибиотикорезистентности у грамотрицательных бактерий является ферментативная инактивация антибактериальных агентов, в частности - продукция β -лактамаз. Данные бактериальные ферменты катализируют гидролиз β -лактамного кольца, что приводит к потере антимикробной активности соответствующих препаратов (Fröhlich et al., 2022; Le Terrier et al., 2023; Hidalgo-Tenorio et al., 2024; Blanco-Martín et al., 2024).

Экспрессия генов, кодирующих синтез β -лактамаз, подвержена регуляции и может индуцироваться при достижении определённых уровней бактерицидного

давления, что позволяет бактериям оперативно адаптироваться к воздействию антибактериальных агентов (Dancer, 2001).

Механизм действия данных ферментов-инактиваторов заключается в специфическом гидролитическом расщеплении β -лактамного кольца - структурного элемента, критически важного для фармакологической активности антибиотиков. В частности, это касается цефалоспоринов, чья эффективность снижается вследствие ферментативной деградации ключевой фармакофорной группы.

β -Лактамазы представляют собой группу бактериальных ферментов, осуществляющих ферментативную инактивацию β -лактамных антибиотиков путём гидролиза амидной связи ($-\text{CO}-\text{NH}-$) в структуре четырёхчленного β -лактамного кольца. Данный процесс приводит к структурной деградации фармакофорной группы антибиотика, что лишает его способности взаимодействовать РВР и подавлять биосинтез клеточной стенки бактерий. В результате антимикробная активность препарата полностью утрачивается (Zdarska et al., 2024).

В зависимости от спектра субстратной специфичности β -лактамазы подразделяют на: ферменты узкого спектра действия и β -лактамазы расширенного спектра (БЛРС), представляющие особую клиническую угрозу ввиду способности гидролизовать широкий спектр β -лактамных антибиотиков, включая цефалоспорины III-IV поколений.

На сегодняшний день приняты две основные системы классификации данных ферментов:

1) Классификация Эмблера (по молекулярной структуре), согласно которой β -лактамазы делятся на четыре класса (А, В, С и D) на основании гомологии аминокислотных последовательностей и структурных особенностей:

Классы А, С и D - сериновые β -лактамазы. Их каталитический механизм основан на образовании ацил-ферментного интермедиата с участием остатка серина в активном центре.

Класс В - металло- β -лактамазы (MBL). Относятся к группе металлоферментов, для функционирования которых требуется наличие одного или двух ионов

цинка (Zn^{2+}) в активном центре, обеспечивающих эффективное каталитическое расщепление β -лактамного кольца.

2) Функциональная классификация по Бушу-Якоби-Медейросу, основанная на субстратной специфичности и чувствительности к ингибиторам. Данная система позволяет оценить клиническую значимость фермента и спрогнозировать эффективность различных классов β -лактамных антибиотиков и их комбинаций с ингибиторами β -лактамаз (Bonomo, 2017; Tooke et al., 2019).

Распространение β -лактамаз, особенно БЛРС и металло- β -лактамаз, является одним из ключевых факторов развития множественной лекарственной устойчивости у грамотрицательных патогенов и представляет серьёзную проблему современной антимикробной терапии.

В соответствии с функциональной классификацией металло- β -лактамаз, представленной в работе Sawa T. и соавторов (2020), данные ферменты подразделяются на три группы, дифференцируемые по характеру взаимодействия с ингибиторами β -лактамаз и субстратной специфичности в отношении β -лактамных соединений.

Группа 1 представлена цефалоспориназами, отнесёнными к молекулярному классу C. Данные ферменты локализованы на хромосомах широкого спектра бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Их каталитическая активность наиболее выражена в отношении цефалоспоринов по сравнению с иными β -лактамными антибиотиками (в т. ч. бензилпенициллинами).

Характерной особенностью цефалоспориназ является резистентность к ингибирующему действию клавулановой кислоты при сохранении чувствительности к цефокситину.

Группа 2 включает сериновые β -лактамазы (молекулярные классы A и D), представляющие собой наиболее распространённую группу β -лактамаз. Для ферментов этой группы характерна повышенная гидролитическая активность в отношении производных пенициллина и бензилпенициллинов. При этом эффективность гидролиза цефалоспоринов, карбапенемов и монобактамов существенно снижена.

β -лактамазы и РВР эволюционно связаны: они происходят от общего белка-предшественника и демонстрируют консервативные структурные элементы.

В обоих типах белков - как в РВР, так и в сериновых β -лактамазах - каталитический остаток Ser в активном центре вступает в реакцию с молекулой β -лактамного антибиотика с образованием ковалентного ацил-ферментного комплекса. Этот процесс инициирует гидролитическое расщепление амидной связи в β -лактамном кольце.

Ключевое различие заключается в обратимости данного взаимодействия: формирование ацил-ферментного комплекса с РВР носит необратимый характер, что приводит к стойкой инактивации фермента и, как следствие, нарушению синтеза клеточной стенки бактерий.

Структурно все сериновые β -лактамазы представляют собой компактные глобулярные белки. Их вторичная структура включает 11 α -спиралей, 5 β -листов, а также участки с нерегулярной конформацией - петли, характеризующиеся неравномерной степенью структурированности (рисунок 1.7(а)).

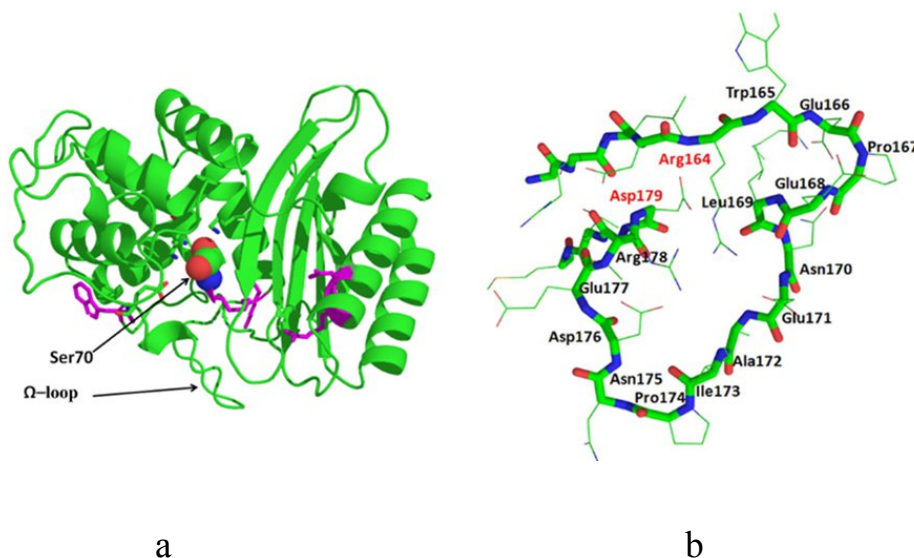


Рисунок 1.7 - а) Структура β -лактамазы ТЭМ-1 класса А; б) Структура Ω -петли в β -лактамазе типа ПЭМ.

Сериновые β -лактамазы характеризуются сложной многоуровневой организацией. В их состав входят три $\alpha/\beta/\alpha$ -домена, стабилизированных сетью ионных и

водородных связей (Stec B. et al., 2005). Ядро молекулы сформировано пространственно упорядоченными α -спиралями и β -листами.

В составе ядра входят 3-4 аминокислотно-консервативных мотива, с остатком серина, занимающим ключевое положение. Функциональная пластичность молекулы обеспечивается конформационной подвижностью петлевых участков, которые являются наиболее вариабельными регионами и часто несут мутационные изменения (Abriata L. A. et al., 2012; Egorov A. et al., 2020).

Ω -петля - эволюционно консервативный структурный элемент, находящийся в нижней части входа в карман активного сайта. В состав Ω -петли входит каталитически значимый консервативный остаток глутамата (Glu), который участвует в процессе деацилирования ацил-ферментного комплекса. На данном этапе каталитического цикла происходит высвобождение гидролизованной молекулы антибиотика из активного центра β -лактамазы, после чего фермент может вновь участвовать в последующих реакциях (Егоров А. М. et al., 2020) (рисунок 1.7(b)).

Гидролиз β -лактамных антибиотиков сериновыми β -лактамазами разных классов схож по механизму и включает в себя три основных этапа (рисунок 1.8 (a)).

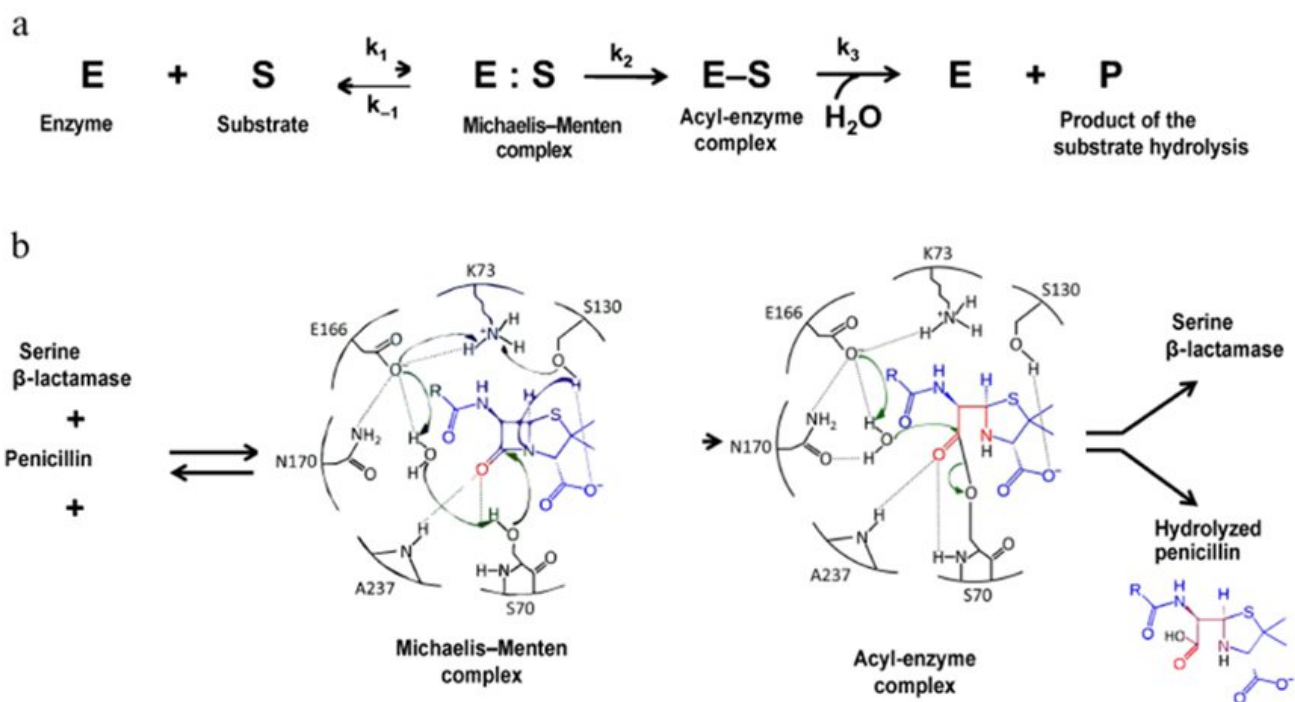


Рисунок 1.8 - а) схема гидролиза β -лактамных антибиотиков β -лактамазами; б) механизм гидролиза пенициллина β -лактамазами класса А

Гидролиз β -лактамных антибиотиков сериновыми β -лактамазами осуществляется за счёт образования ковалентного ацил-ферментного комплекса, участником которого является остаток Ser. Стабильность промежуточного комплекса обеспечивается взаимодействием с окружающими аминокислотными остатками.

Механизм катализа включает несколько последовательных стадий. На начальном этапе молекула антибиотика специфически ориентируется и связывается в активном центре фермента, что сопровождается активацией гидроксильной группы каталитического Ser.

В β -лактамазах класса А типа TEM активация каталитического Ser требует его депротонирования, которое осуществляется за счёт остатка Lys73. Данный процесс протекает посредством формирования цепи водородных связей, включающей молекулу воды и аминокислотные остатки Glu166 и Asn170, локализованные в Ω -петле (рисунок 1.8(b)) (Tooke et al., 2019).

Альтернативный путь депротонирования Lys73 реализуется при участии остатка Ser130 петли SDN (Ser130-Asn132).

После активации гидроксильная группа SER выступает в роли нуклеофила и атакует карбонильный атом углерода β -лактамного кольца. В результате образуется высокореакционное тетраэдрическое промежуточное соединение. Затем оно трансформируется в низкоэнергетический ацил-ферментный комплекс, характеризующийся ковалентной связью между Ser активного центра и молекулой антибиотика.

На третьей стадии каталитического цикла сериновых β -лактамаз происходит гидролитическое расщепление ацил-ферментного комплекса. Молекула воды координируется в активном центре фермента посредством взаимодействия с остатком Glu166 и другими заряженными аминокислотными остатками. Ω -петля участвует в позиционировании молекулы воды и стабилизации переходного состояния.

В результате нуклеофильной атаки молекулы воды на ацилированный остаток Ser происходит деацилирование - разрыв ковалентной связи между ферментом и фрагментом антибиотика. Это сопровождается гидролизом амидных связей в

структуре β -лактамного кольца. В итоге молекула расщеплённого антибиотика покидает активный центр, а фермент возвращается в исходное состояние, готовое к участию в следующем каталитическом цикле (Drawz et al., 2010).

3 группа -MBL, соответствующие классу В, отличающихся по механизму действия от сериновых ферментов. Для представителей этого класса характерна низкая гидролитическая активность в отношении монобактамов. Важной особенностью металло- β -лактамаз является их резистентность к классическим ингибиторам β -лактамаз, таким как clavulanовая кислота. При этом активность данных ферментов эффективно подавляется хелатирующими агентами, связывающими ионы металлов, например, этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА).

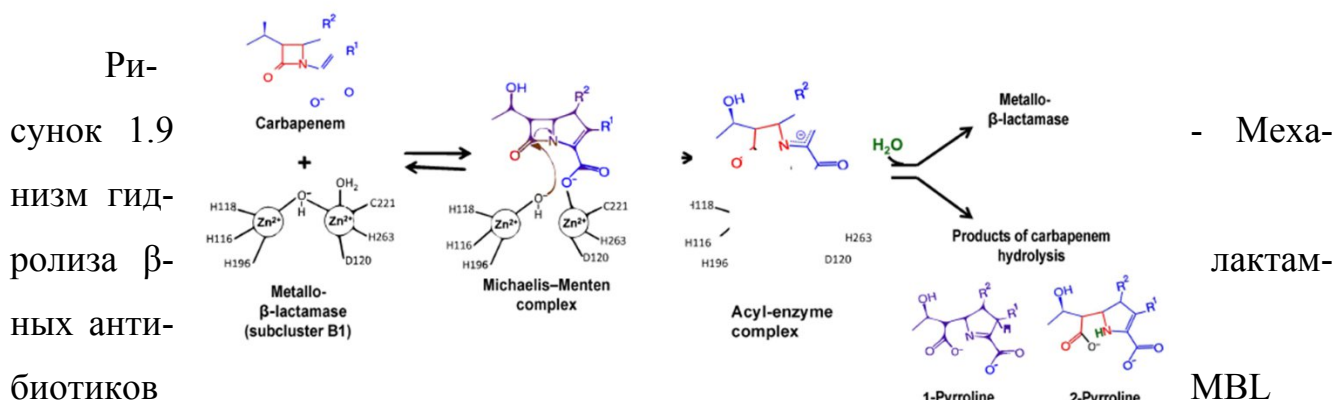
Активный центр MBL локализован в области широкой неглубокой канавки, сформированной между двумя β -листами. Такая структурная организация обеспечивает доступность каталитической зоны для субстрата и участвует в позиционировании молекулы антибиотика в процессе катализа.

Ион Zn^{2+} в MBL окружают 2 молекулы воды, которые выполняют различные функциональные роли. Так мостиковая молекула воды осуществляет связь между двумя ионами металла, обеспечивая пространственное взаимодействие. Апикальная молекула воды формирует координационную связь исключительно со вторым ионом Zn^{2+} и участвует в активации нуклеофила для последующего гидролиза субстрата.

Металло- β -лактамазы субкластеров В1 и В3 характеризуются наличием подвижной петли L3, локализованной вблизи входа в активный центр - между $\alpha 3$ -спиралью и $\beta 7$ -листом. При связывании субстрата происходит конформационное изменение петли L3. Это приводит к локальному изменению эффективных значений диэлектрической проницаемости микроокружения, что способствует стабилизации промежуточных форм фермент-субстратного комплекса (Malabanan M. M. et al., 2010; Palzkill T., 2013).

Механизм связывания антибиотика двухцинковыми MBL включает координацию второго иона Zn^{2+} с карбоксильной группой субстрата, что индуцирует вы-

свобождение гидроксид-иона, играющего роль нуклеофила в каталитическом гидролизе β -лактамного кольца (рисунок 1.10) (Tooke et al., 2019).



В ходе каталитического гидролиза β -лактамных антибиотиков MBL ион металла (Zn^{2+}) оказывает электроноакцепторное воздействие на карбонильный атом кислорода β -лактамного кольца. Это приводит к оттягиванию электронной плотности от атома кислорода, что способствует увеличению и стабилизации его частичного положительного заряда.

Гидроксид-ион (OH^-), координированный ионом Zn^{2+} , выступает в роли более сильного нуклеофила по сравнению с молекулой воды. Он атакует электронодефицитный карбонильный атом углерода молекулы антибиотика, инициируя разрыв β -лактамного кольца.

Образующийся промежуточный продукт характеризуется наличием отрицательного заряда, делокализованного в структуре пирролидинового кольца. Дальнейшее протекание реакции возможно по двум альтернативным путям:

1) Протонирование атома углерода с участием молекулы воды, приводящее к образованию 1-пирролина.

2) Протонирование атома азота, в результате которого формируется 2-пирролин.

2. Резистентность бактерий к β -лактамным антибиотикам, в т.ч. цефалоспорином, может формироваться вследствие структурных модификаций РВР - молекулярных мишеней данных антибактериальных агентов.

Механизмы модификации РВР включают:

- формирование мутантных вариантов РВР, характеризующихся существенно сниженным сродством к β -лактамным соединениям;
- экспрессию новых изоформ РВР, принципиально не взаимодействующих с β -лактамной структурой.

Данные процессы относятся к группе механизмов резистентности, основанных на модификации мишени действия антибактериального вещества. Эта группа отличается высокой гетерогенностью и объединяет разнообразные молекулярные стратегии, направленные на снижение аффинности связывания антибиотика с целевым белком (Baran et al., 2023).

3. Снижение количества антибиотиков, достигающих цели, приводит к формированию фенотипа лекарственной устойчивости. Для грамотрицательных бактерий резистентность может возникать из-за низкой мембранной проницаемости антибиотиков. Структурные или количественные изменения в пороне - бактериальном наружном мембранном белке, транспортирующем гидрофильные молекулы, - могут подавлять проникновение цефалоспоринов. Эти изменения порона в основном связаны с точечными мутациями или пониженной экспрессией генов. Кроме того, насос выброса способствует устойчивости к антибиотикам, ингибируя диффузию лекарств. Энергетическая система вытока изгоняет антибиотики из периплазматического пространства грамотрицательных бактерий, где расположен слой пептидогликана.

1.5 Противомикробные препараты фенольного происхождения

Противомикробные препараты фенольного происхождения представляют перспективную альтернативу или дополнение к антибиотикотерапии инфекций. Их антимикробное действие реализуется через ряд механизмов: подавление бактериальной физиологии, ингибирование биоплёнок, снижение антибиотикорезистентности и вирулентности. Они способны привести к истощению запасов АТФ, нарушить целостность и проницаемость клеточной мембраны, ингибировать β -лактамаз, снизить персистенцию и патогенность бактерий за счёт подавления экспрес-

сии генов вирулентности и образования биоплёнок (AlSheikh et al., 2020; Keyvani-Ghamsari et al., 2023; De Rossi et al., 2025; WHO 2026).

1.5.1 Механизмы ингибирования антибактериальных агентов фенольного происхождения

С давних времен растения используются в качестве источников лекарственных средств. Они способны синтезировать два вида метаболитов: первичные – те, что необходимы для их жизнедеятельности, и вторичные – те, образуются в ответ на взаимодействие с окружающей средой (Pott et al., 2019).

Продукты гликолиза, шикиматного пути и цикла трикарбоновых кислот обеспечивают питание и размножение растений (Pagare et al., 2015) и относятся к первичным метаболитам. Они также выступают предшественниками тысяч вторичных метаболитов, которые формируются на различных этапах первичных метаболических путей (Cardoso et al., 2019). Ферментативная активность в отношении первичных метаболитов играет важную роль в синтезе новых соединений, помогающих растениям адаптироваться к биотическим (бактерии, грибы, насекомые, болезни) и абиотическим (травмы, температура, влажность) стрессовым факторам (Pott et al., 2019).

Фенольные фитометаболиты представляют собой вторичные метаболиты, которые синтезируются в различных частях растений - корнях, листьях, коре, цветах и семенах - и отличаются значительным структурным разнообразием (Cutillo et al., 2006).

На протяжении многих десятилетий эти соединения привлекают пристальное внимание фармацевтической промышленности. Их исследуют как средство для усиления биологической активности существующих антибиотиков и потенциальный источник новых противомикробных препаратов, эффективных против широкого спектра патогенов, в том числе мультирезистентных бактерий.

В зависимости от биосинтетического происхождения антибактериальные фитохимические вещества классифицируют по химической структуре на следующие группы:

- 1) алкалоиды;
- 2) полифенолы;
- 3) терпеноиды;
- 4) кумарины (Pagare et al., 2015).

Особого внимания заслуживают полифенолы (рисунок 1.10) - обширная группа вторичных растительных метаболитов с выраженным фармакологическим действием (Othman et al., 2019).

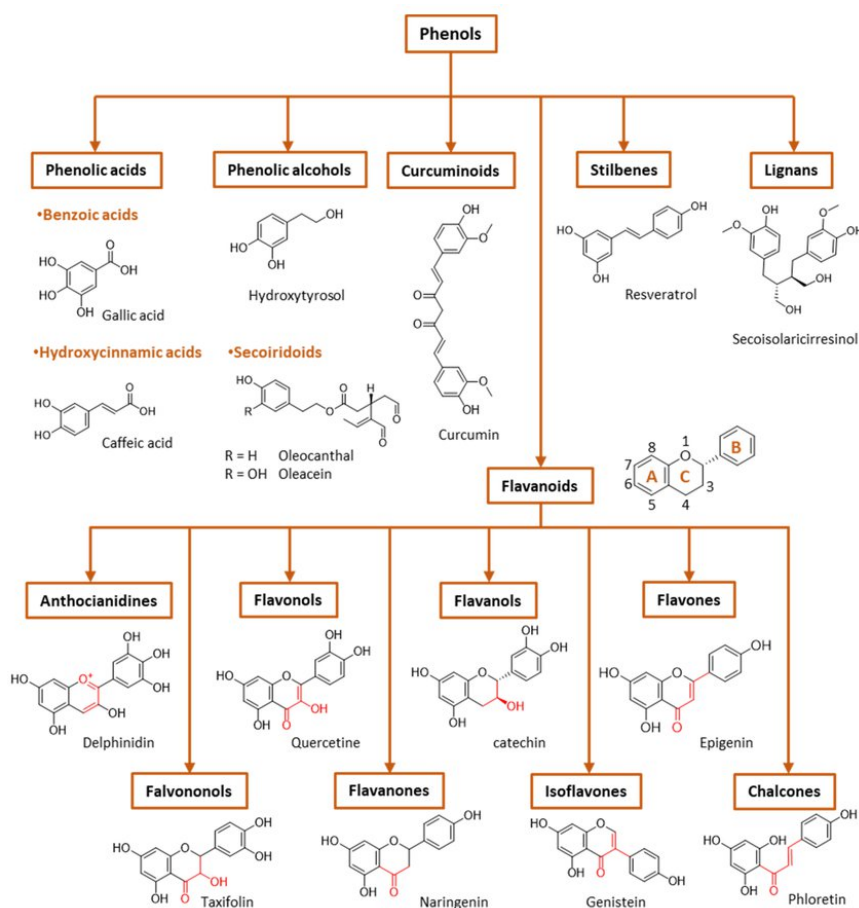


Рисунок 1.10 - Классификация полифенолов

На сегодняшний день идентифицировано свыше 8 000 биологически активных полифенолов. Основная их функция - антиоксидантная: они защищают клетки

как самих растений, так и организма человека от повреждения свободными радикалами (Malik et al., 2016; Aslam et al., 2017).

Полифенолы выполняют не только ключевую антиоксидантную функцию, но и проявляют ряд других биологических эффектов, включая:

- противовоспалительное;
- противоаллергическое;
- противоопухолевое;
- гипотензивное;
- антимикробное действие (Lin et al., 2016).

Точный механизм антимикробного действия полифенолов пока остаётся предметом исследований. Согласно данным ряда работ, на клеточном уровне эти соединения взаимодействуют с бактериальными ферментами посредством водородных связей, что приводит к изменениям проницаемости клеточных мембран и нарушению целостности клеточной стенки (Ganesan et al., 2017).

Многочисленные исследования подтверждают, что фенольные вторичные метаболиты способны:

- подавлять синтез нуклеиновых кислот;
- нарушать функции цитоплазматической мембраны;
- влиять на энергетический метаболизм бактерий (Górniak et al., 2019; Biharee et al., 2020; Silva et al., 2023).

Кроме того, установлено, что они:

- снижают адгезию бактерий и образование биоплёнок;
- изменяют количество поринов на клеточной мембране;
- влияют на проницаемость мембран;
- уменьшают патогенность микроорганизмов.

Эти эффекты критически важны для подавления роста и размножения бактерий (Biharee et al., 2020; Silva et al., 2023).

1.5.2 Комбинации фенольных фитометаболитов и антибактериальных препаратов

Фенольные фитометаболиты усиливают действие антибиотиков за счёт синергии: их совместное применение снижает минимальную ингибирующую концентрацию (MIC) антибиотиков против бактериальных штаммов (Silva et al., 2019), что ускоряет уничтожение бактерий и снижает риск развития устойчивости.

Молекулярные механизмы такого взаимодействия изучены недостаточно, хотя их понимание критически важно для создания новых терапевтических подходов.

Фенилпропаноиды и флавоноиды - распространённые фенольные фитометаболиты с антимикробной активностью против бактерий, грибов и пищевых патогенов (Ruwizhi et al., 2020; Liga et al., 2023). Их антиоксидантные свойства связаны с наличием гидроксильных групп и ненасыщенных двойных связей, взаимодействующих с радикалами и окислителями.

Структура бензольного кольца в составе фенольных кислот обеспечивает их способность проникать через клеточные мембраны и проявлять биологическую активность (Nemaiswarya et al., 2010).

Широко распространённые в растительном мире фенилпропаноиды (структура C₆-C₃), включая производные коричной кислоты - п-кумаровую, кофейную, феруловую и синапиновую кислоты, встречаются в свободной форме в коре, фруктах, цельных зёрнах и овощах (Guzman, 2014).

Гидроксикоричные кислоты (кофейная, феруловая, синаповая) проявляют антимикробную активность против *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* (Chen, 2016; Zhang et al., 2020).

Кофейная кислота:

- ингибирует бактериальную РНК-полимеразу;
- демонстрирует синергию с фосфомицином против *L. monocytogenes*;
- потенцирует действие норфлоксацина (*S. aureus*), имипенема (*E. coli*) и гентамицина (*P. aeruginosa*) (Lima et al., 2016);

- повышает проницаемость бактериальной мембраны, способствуя высвобождению клеточного содержимого и облегчая доступ гидрофобных антибиотиков.

n-Кумаровая кислота демонстрирует антимикробную активность против *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. dysenteriae* и *S. typhimurium* (MIC 10-80 мкг/мл). Её бактерицидное действие реализуется через разрушение бактериальных мембран, связывание с геномной ДНК и подавление клеточных функций (Lou et al., 2012).

Синапиновая кислота (3,5-диметокси-4-гидроксикоричная кислота) - перорально биодоступный натуральный продукт, выделенный из метанольного экстракта семян жёлтой горчицы.

Среди фенольных фитометаболитов наиболее изучены апигенин и лютеолин, обладающие противомикробной активностью в отношении широкого спектра бактерий и их штаммов (Farhadi et al., 2019).

Исследования подтвердили синергетическое взаимодействие лютеолина и апигенина с левофлоксацином против *P. aeruginosa*. Также апигенин проявлял аддитивный эффект с триметопримом в отношении *E. Coli* (Hanci et al., 2023).

Флавонолы - одни из наиболее распространённых флавоноидов, обладающие выраженной антимикробной активностью против грамположительных и грамотрицательных патогенов, в т. ч. резистентных штаммов (Abbas et al., 2017). К их числу относятся кверцетин и кемпферол.

Кверцетин проявляет синергию с рядом антибиотиков против резистентных бактерий:

- с амоксициллином - против *S. epidermidis* (устойчивых только к амоксициллину), хотя активность комбинации снижена (Daglia, 2012). Кверцетин ингибирует синтез β -лактамаз и пептидогликанов, повышает проницаемость мембран.

- с левофлоксацином, цефтриаксоном, гентамицином, тобрамицином и амикацином - против *P. aeruginosa*: ингибирование биоплёнок ≥ 80 %, гибель клеток 68-85 % (Yuheng et al., 2019).

- с тетрациклином (низкие дозы) - против устойчивой *E. coli* в модели на мышах: разрушает оболочку клеток, вызывает лизис (Farhadi et al., 2019).

Результаты подтверждают перспективность сочетания антибиотиков с фитохимическими веществами для борьбы с бактериальной резистентностью.

Кемпферол и его производные из *B. pinnatum* проявляют антибактериальную активность против резистентных *S. aureus* и *P. aeruginosa* (Siriwong et al., 2016), в т.ч. против *MRSA* (Virin et al., 2020). Механизм связан с ингибированием насоса оттока NorA (Qu et al., 2019). Комбинация кемпферола (и/или кверцетина) с антибиотиками (цефиксимом, цефтриаксоном, ципрофлоксацином и др.) восстанавливает их активность против *MRSA* и снижает MIC (Ndendoung et al., 2012).

Экстракт зелёного чая (*Camellia sinensis*) также обладает антиоксидантными и антимикробными свойствами, активен против резистентных штаммов *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *E. coli* (Shao et al., 2016; Holler et al., 2012). Его ключевое действующее вещество - катехин, богатый полифенол.

В зеленом чае присутствуют четыре формы катехина; эпикатехин (ЭК), эпигаллокатехин (ЭГК), ЕС-3-галлат (ЭКГ) и ЭГК-3-галлат (ЭГКГ) (Shao et al. 2016).

Катехин - фитохимическое соединение с доказанным фармакологическим потенциалом (Shao et al., 2016; Prakash et al., 2018; Garg et al., 2017):

1) проявляет хелатирующую активность по отношению к металлам, что обуславливает его более высокую антиоксидантную эффективность по сравнению с витамином С (Prakash et al., 2018);

2) экстракт зелёного чая с катехинами активен против *P. aeruginosa* (Shao et al., 2016);

3) галлаты катехина снижают резистентность *MRSA* путём ингибирования насоса оттока NorA.

Халконы - важные вторичные метаболиты растений и предшественники флавоноидов/изофлавоноидов (Gopal et al., 2016), обладающие антимикробной активностью за счёт ингибирования насоса оттока NorA (Archana et al., 2011).

Ключевые исследования:

1) Халкон и дигидрохалкон из *Uvaria chamae* P. активны против грамположительных патогенов с множественной устойчивостью (Mahmood H.Y. et al., 2016).

2) 10 халконов (идентифицированы МС-анализом) ингибируют рост VRE, *MRSA*, *S. aureus* (Mahmood H.Y. et al., 2016).

3) 7,9,2',4'-тетрагидрокси-8-изопентенил-5-метоксихалкон (*Sophora flavescens*) активен против *MRSA*/VRE отдельно и в комбинации с ампициллином/гентамицином (Matos M.J. et al., 2015).

4) 4',6'-дигидрокси-3',5'-диметил-2'-метоксихалкон (*Dalea versicolor*) снижает МІС эритромицина с 0,4 до 0,1 мкг/мл (Archana et al., 2011).

Комбинация халконов с антибиотиками перспективна для преодоления резистентности.

Исследования показывают, что синтезированные производные флавоноидов могут превосходить природные аналоги по антибактериальной активности (Koudokpon et al., 2018).

Различные механизмы призваны объяснить антибактериальное действие флавонов и изофлавонов фитохимических веществ (Abbas et al. 2017). Флавоны могут образовывать комплекс с компонентами клеточной стенки бактерий, препятствуя дальнейшей адгезии. Примером такого механизма является биоактивное соединение ликофлавона, выделенное из цветков *Retama raetam*, которое активно ингибирует рост *E. coli* с МІС 7,81 мкг/мл (Babii et al. 2016).

Ингибирование бактериальных ферментов является еще одним механизмом, как в случае с соединением артокарпина, выделенным из листвы *Artocarpus anisophyllus* Miq. Это фитохимическое вещество оказывает антибактериальное действие в отношении *E. coli* и *P. aeruginosa* (Prasad et al. 2008). Было оценено несколько исследований синергетического эффекта флавонов с хорошо известными антибиотиками, включая ингибирование насосов бактериального оттока и повышение чувствительности к антибиотикам (Abbas et al. 2017).

Байкалеин представляет собой тригидроксифлавоны, присутствующие в корнях *Scutellaria baicalensis* Georgi. и обладает различными биологическими активностями, такими как противовирусные, антибактериальные, противовоспалительные, противоопухолевые и антиоксидантные свойства (Alam et al. 2015). Байкалеин восстанавливает активность тетрациклина и β -лактамов в отношении *MRSA* и *E.*

coli через механизм EPI (Edziri et al. 2012). В другом исследовании комбинация байкалеина с оксациллином и ванкомицином оценивалась в отношении *MRSA* и *VRE*. Как механизм, эта комбинация оказывает бактерицидное действие за счет ингибирования синтеза бактериальной клеточной стенки. Исследование Time Kill показало, что рост бактерий заметно замедлился через 2-6 ч (Farhadi et al. 2019).

Дубильная кислота также проявляет антимикробный потенциал:

- модулирует эффлюкс у *MRSA* (Khan et al., 2018);
- предотвращает развитие устойчивости, вызванной мутациями при длительном применении фузидиевой кислоты;
- при совместном применении с фузидиевой кислотой блокирует мутагенез, выступая альтернативной мишенью для бактерий и способствуя лизису клеток (Khan et al., 2018).

Фенольные кислоты - это класс природных соединений, характеризующихся наличием одной карбоксильной группы и нескольких гидроксильных групп, присоединённых к ароматическому кольцу (Patel et al., 2015).

Существует способ повышения ингибирующей активности антибиотика комплексом фенольных соединений, включающий выделение комплекса фенольных соединений водно-спиртового экстракта из *Taraxacum*, полученные фенольные соединения смешивают с цефтазидимом в концентрациях: цефтазидим 0,0038 мг/л и фенольные соединения 1,406 мг/л в отношении бактерий *P. aeruginosa* и цефтазидим 0,00006 мг/л и фенольные соединения 5,625 мг/л в отношении бактерий *S. aureus*. В отношении *S. aureus* достоверно значимые результаты ($p < 0,001$) увеличения ингибирующего действия цефтазидима регистрируется в комплексе с суммарными фенольными соединениями в дозе 5,625 мг/л, в отношении *P. aeruginosa* 1,406 мг/л, соответственно (RU 2839893, 2025).

Особое внимание заслуживает галловая кислота (Jiamboonsri P., et al., 2025), которая оказывает выраженное антимикробное действие в отношении *E. coli* и *P. aeruginosa*. Механизм её действия включает: снижение отрицательного поверхностного заряда клеточной мембраны; формирование пор в мембране; изменение гидрофобных свойств мембраны.

Эти процессы приводят к нарушению целостности мембраны и утечке внутриклеточного содержимого бактерий (Patel et al., 2015).

Дальнейшие исследования должны быть направлены на идентификацию активных фитохимических веществ и изучение механизмов их действия.

1.5.3 Химия белок-фенольных взаимодействий

Взаимодействие белков и фенольных соединений реализуется посредством двух типов связей: ковалентных и нековалентных (Zhang et al., 2021; Günal-Köroğlu et al., 2023; Wang et al., 2025).

Механизмы взаимодействия:

Ковалентные взаимодействия характеризуются образованием необратимых связей между молекулами белка и фенольными соединениями. Их формирование происходит при определённых условиях, в т. ч. в присутствии фенольных оксидаз и в щелочных средах (Zhang et al., 2021).

Нековалентные взаимодействия представляют собой обратимые связи, формируемые за счёт следующих типов сил: электростатических взаимодействий, водородных связей, гидрофобных взаимодействий и ионных связей.

Последствия таких взаимодействий заключаются в изменении функциональных и биологических свойств как белковых молекул, так и фенольных соединений (рисунок 1.11).

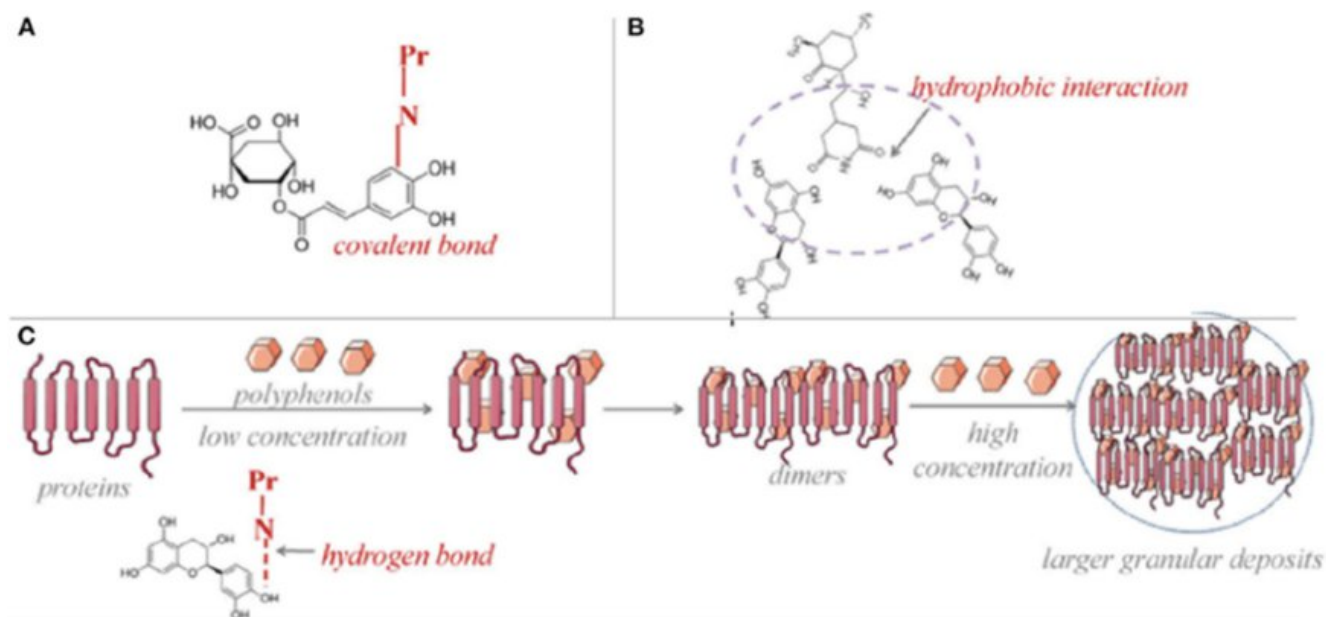


Рисунок 1.11 - Механизмы взаимодействия белков с фенольными соединениями: конъюгация посредством ковалентной связи (А), комплексообразование посредством гидрофильных взаимодействий (В) и водородных связей (С)

Ковалентное связывание молекул белка и фенольных соединений осуществляется посредством двух механизмов: ферментативного и неферментативного.

1. В основе ферментативного механизма лежат реакции с участием фенольных оксидаз, в т. ч. лакказы и тирозиназы (Chu Q. et al., 2018).

Процесс включает следующие этапы:

- 1) превращение фенолов в промежуточные продукты - семихиноны и хиноны;
- 2) взаимодействие этих промежуточных соединений с нуклеофильными боковыми цепями аминокислот;
- 3) образование ковалентных связей типа C-S или C-N между молекулами (Chu Q. et al., 2018).

2. Неферментативный механизм включает следующие основные методы реализации:

- 1) прививка свободных радикалов;
- 2) щелочная реакция (Sui X. et al., 2018).

и этапы процесса:

- 1) окисление фенольных соединений при контакте с воздухом в щелочных условиях;
- 2) последовательное превращение в семихиноны, а затем в хиноны;
- 3) реакция остатков нуклеофильных аминокислот (Lys, Try, Met, Cys) с высокореактивными хинонами;
- 4) формирование ковалентных перекрёстных связей между белками и фенольными соединениями (Sui X. et al., 2018).

Дополнительно в методе свободных радикалов часто применяют окислительно-восстановительную пару перекись водорода (H_2O_2) и аскорбиновую кислоту (He W. et al., 2019). Они генерируют гидроксильные радикалы, которые:

- окисляют аминокислоты на боковых цепях белков;
- инициируют реакцию с фенольными соединениями;
- приводят к образованию сшитых сопряжённых структур (He W. et al., 2019).

Нековалентные взаимодействия между белками и фенольными соединениями представляют собой обратимые процессы, включающие следующие типы связей (Zhang et al., 2021; Wang et al., 2025):

- водородные связи;
- гидрофобные взаимодействия;
- электростатические взаимодействия;
- силы Ван-дер-Ваальса.

Механизмы нековалентных взаимодействий:

-1) водородные связи формируются между гидроксильными группами фенольных соединений (выступающих в роли доноров водорода) и атомами кислорода или азота в белковых молекулах - в частности, с карбоксильными, гидроксильными и аминогруппами (Zhang et al., 2021, Wang et al., 2025); 2) гидрофобные взаимодействия возникают за счёт ассоциации неполярного ароматического кольца фенольных соединений с гидрофобными участками белковых молекул (Chu et al., 2018); 3) электростатические взаимодействия происходят между заряженными группами белков и гидроксильными группами фенолов.

Согласно литературным данным, большинство природных взаимодействий между белками и фенольными соединениями носят нековалентный характер (Sinha et al., 2021; Xiao et al., 2023; Xue et al. 2024; Lešnik et al., 2025).

В отличие от нековалентных, ковалентные взаимодействия являются необратимыми и более стабильными. Тем не менее оба типа взаимодействий - и ковалентные, и нековалентные - изменяют химическую структуру белков и фенольных соединений, что приводит к модификации их функциональных и биологических свойств (Yilmaz et al., 2022; Feng et al. 2023; Zhang et al., 2024).

Заключение к обзору литературы

Проведённый анализ литературных источников позволил всесторонне рассмотреть ключевые аспекты применения β -лактамов в современной антибактериальной терапии, с уточнением, что их клиническая эффективность ограничена распространением резистентности. Понимание молекулярных механизмов действия β -лактамов и их ключевых белков-мишеней критически важно для разработки новых терапевтических стратегий, предусматривающих комбинации антибиотика с иными антибактериальными агентами.

Полученные данные формируют теоретическую основу для дальнейших экспериментальных исследований, направленных на создание новых антибактериальных комплексов на основе модифицированных β -лактамных структур и фенольных фитометаболитов.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристики объектов исследования

2.1.1 Характеристика цефтазидима

Цефтазидим относится к цефалоспорином третьего поколения и был внедрён в клиническую практику в 1980-х годах благодаря широкому спектру антимикробной активности. Препарат эффективен в отношении грамположительных кокков и грамотрицательных бацилл, в том числе *P. aeruginosa* (Sudharsan R, et al. 2024; Castro-Pérez J/ et al. 2025).

Химическая структура цефтазидима - (6R,7 R,Z)-7-(2-(2-аминотиазол-4-ил)-2-(2-карбоксипропан-2-илоксиимино)ацетамидо)-8-оксо-3-(пиридиний-1-илметил)-5-тиа-1-аза-бицикло(4.2.0)окт-2-ен-2-карбоксилат (молекулярная формула, $C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$; молекулярная масса 546,58 г/моль) (рисунок 2.1).

Как и другие представители класса цефалоспоринов, цефтазидим содержит цефедное ядро. Оно представляет собой бициклическую кольцевую систему: четырёхчленное β -лактамное кольцо слито с шестичленным дигидротиазинным

кольцом. В структуре присутствуют: атом серы в положении 1, двойная связь в положении 3 и карбоновая кислота в положении 4.

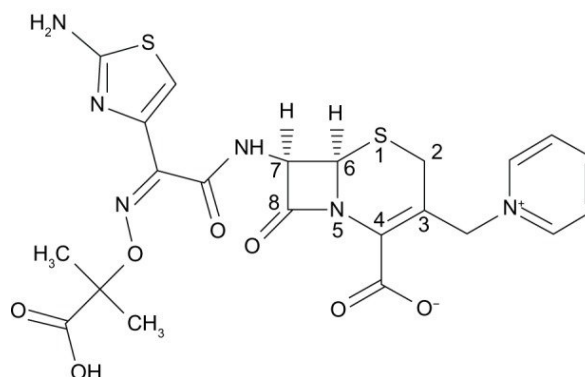


Рисунок 2.1 - Химическая структура цефтазидима

Специфические свойства цефалоспоринов определяются боковыми цепями, присоединёнными к цефемному ядру в положениях 3 и 7 (Caprile, 1988).

В положении 3 у цефтазидима находится группа метилпиридиния, которая выполняет две ключевые функции: обеспечивает активность в отношении *P.aeruginosa* и повышает растворимость в воде за счёт цвиттерионных свойств (Beale et al., 2011; Lin et al., 2022).

В позиции 7 молекула цефтазидима содержит аминокислотную группу, включающую: аминотиадиазольное кольцо и карбоксипропил-оксииминную цепь, связанную с α -углеродным атомом.

Аминотиадиазольное кольцо - распространённая структурная особенность цефалоспоринов расширенного спектра действия. Его присутствие повышает активность препаратов против грамотрицательных бацилл.

Карбоксипропил-оксииминная группа обеспечивает значительно более высокую активность в отношении *P. aeruginosa* и несколько сниженную активность против представителей семейства *Enterobacteriaceae* по сравнению с метоксииминной группой, характерной для большинства других цефалоспоринов третьего поколения. При этом обе группы - как карбоксипропил-оксииминная, так и метоксииминная - демонстрируют сопоставимую стабильность в отношении β -лактамаз (Neu, 1983; Lagacé-Wiens et al. 2015; Marino et al. 2023).

Согласно данным, представленным на рисунке 2.2, молекула цефтазидима содержит боковую цепь R₁ с 2-аминотиазольной группой.

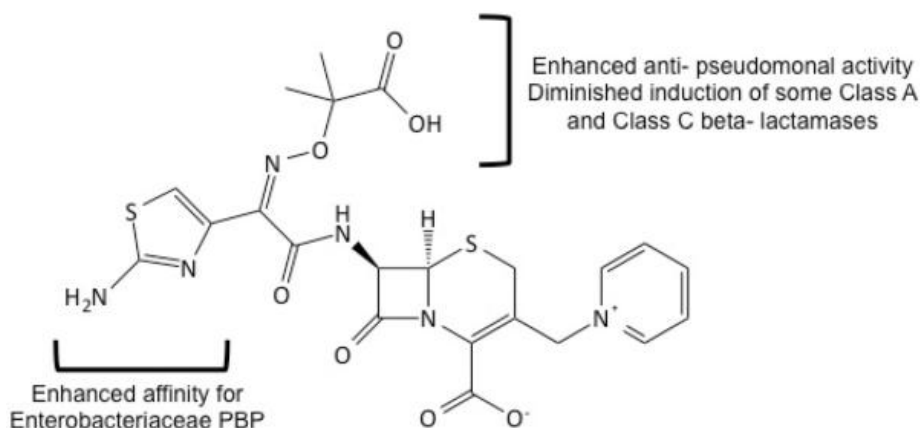


Рисунок 2.2 - Функциональные группы цефтазидима

Наличие этой структурной особенности выполняет две ключевые функции: повышает сродство препарата к РВР-3 у широкого спектра грамотрицательных микроорганизмов и снижает субстратную активность цефтазидима в отношении ряда β -лактамаз, включая ранние (узкоспектральные) варианты ферментов TEM, OXA и SHV (Singh D.S., et al., 2021; Marino et al., 2023).

В отличие от большинства цефалоспоринов третьего поколения, в структуре цефтазидима присутствует α -углеродная диметилуксусная кислота вместо типичной метоксиаминогруппы. Данная структурная модификация обуславливает специфический профиль антимикробной активности препарата: значительно повышенную эффективность в отношении видов *Pseudomonas*; умеренное усиление активности против отдельных представителей семейства *Enterobacteriaceae*; снижение эффективности против грамположительных микроорганизмов (Candel FJ. et al., 2022; Lin et al., 2022).

Введение боковой цепи пропилкарбоксила повышает сродство цефтазидима к РВР *P. aeruginosa*, одновременно снижая индукцию β -лактамаз классов А и С по сравнению с другими цефалоспоридами II и III поколений. Тем не менее цефтазидим проявляет нестабильность в присутствии β -лактамаз Ambler класса С, ESBL и карбапенемаз (Marino et al.2023; Smith et al., 2024).

2.1.2 Бактериальные штаммы

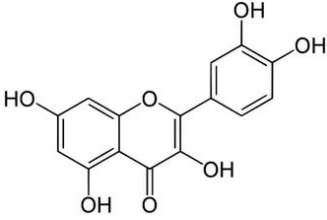
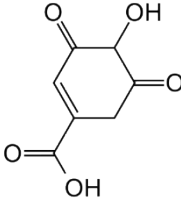
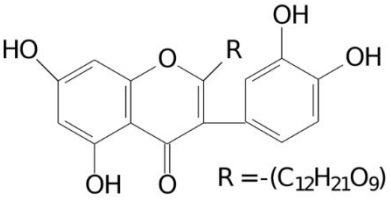
Для оценки активности цефтазидима и его комплексов с фитометаболитами в качестве контрольного (чувствительного) объекта был использован референсный штамм *S. aureus* ATCC 29213. Его хорошо изученные биохимические свойства и подтверждённая чувствительность к β -лактамным антибиотикам позволяют валидировать методологию исследования. В качестве референсного штамма *P. aeruginosa* использован ATCC 27853 — стандартизованный контрольный штамм с подтверждённой чувствительностью к β -лактамным антибиотикам, рекомендованный CLSI для тестирования антибактериальной активности. Данные штаммы применяли для валидации методологии оценки МИК цефтазидима и его комбинаций с фенольными фитометаболитами. Для культивирования микроорганизмов были использованы стандартные питательные среды Мюллера-Хинтона (Condalab, Испания). Инкубацию бактерий проводили при 37°C.

2.1.3 Фенольные фитометаболиты

В работе были исследованы 3 образца фенольных соединений (таблица 2.1) растительного происхождения с предварительно установленной выраженной антибактериальной активностью: кверцетин (Nguyen, 2022; IntechOpen, 2026), галловая кислота (Borges et al., 2013; Gobin et al., 2022; Li et al., 2024; Abdel Bar et al., 2024) и рутин (Gopinath, 2022; Esnaashari et al., 2024; Abo-Qotuf et al., 2024). Кверцетин (чистота 98 %), Россия; галловая кислота (чистота 98%), Scharlab, (Испания); рутин (чистота 97%), Acros Organics (Бельгия).

Таблица 2.1 - Структуры и мишени фенольных фитометаболитов

Наименование	Кверцетин	Галловая кислота	Рутин
--------------	-----------	------------------	-------

Структурная формула			
Мишень	- мембрана; - ДНК; - синтез белка; - quorum sensing; - биоплёнки.	- мембрана; - ДНК-гираза; - окислительный стресс; - quorum sensing; - биоплёнки; - эффлюкс-насосы; - хелатирование металлов.	- мембрана; - ДНК-гираза; - биоплёнки; - quorum sensing; - эффлюкс-насосы; - хелатирование ионов железа.

2.1.4 Бактериальные белки-мишени

Для анализа воздействия антибактериальных агентов на микроорганизмы были выбраны 3 белка-мишени (таблица 2.2), относящиеся к двум различным классам ферментов: РВР и β -лактамазы. Это белки: РВР 3 - Penicillin-Binding Protein 3, организм - *Pseudomonas aeruginosa*; PC1 семейства BlaZ - β -лактамаза (гидролаза), организм - *Staphylococcus aureus*; ОХА-10 - β -лактамаза (гидролаза), организм - *Pseudomonas aeruginosa*.

Таблица 2.2 - Характеристика белков - мишеней

Белок-мишень	Класс	Количество аминокислотных остатков	Молекулярный вес (кДа)	Микроорганизм
РВР 3	РВР	564	61,7	<i>Pseudomonas</i>

				<i>aeruginosa</i>
BlaZ	β -лактамаза	257	28.84	<i>Staphylococcus aureus</i>
OXA-10	β -лактамаза	984	110.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

2.2. Методы исследования

Методология исследования была сформирована в соответствии с поставленной целью диссертационной работы (рисунок 2.3).

Для подтверждения или опровержения формирования молекулярных комплексов проводили анализ распределения электронной плотности на атомах и электростатического потенциала, и регистрировали спектры поглощения чистых веществ - как в индивидуальном виде, так и в комбинации с цефтазидимом.

Механизм действия цефтазидима и фенольных фитометаболитов на белки-мишени изучали с привлечением методов квантовой химии.

Минимальную ингибирующую концентрацию цефтазидима и фенольных фитометаболитов определяли референтным методом микроразведений. Для выявления присутствия β -лактамаз использовали специализированные тест-системы «BETA LACTAMASE STICKS» (Италия).

Оценку ингибирующего действия антибактериальных веществ в отношении исследуемых микроорганизмов осуществляли с применением диффузионного метода агаровых лунок.

Полученные результаты анализировали с помощью программных пакетов Microsoft Excel, Statistica 10 и R 4.5.

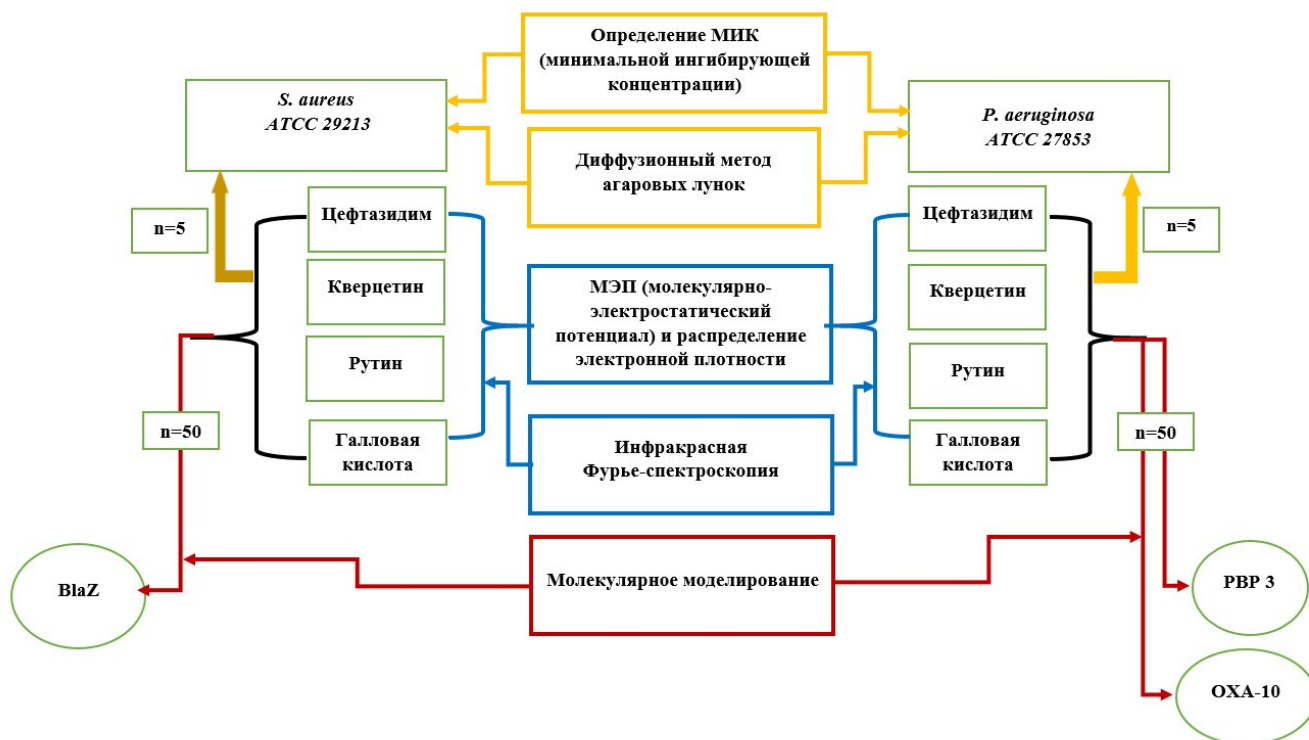


Рисунок 2.3 - Общая схема эксперимента

2.2.1 Спектральный анализ

Для подтверждения или опровержения формирования молекулярных смешаннолигандных комплексов были получены инфракрасные спектры чистых веществ и растительных экстрактов (как отдельно, так и в комбинации с цефтазидимом) с использованием: Фурье-спектрометра «ИНФРАЛЮМ ФТ-02» и ИК-Фурье спектрометра Bruker Alpha (без приставки НПВО).

Анализ спектров выявил следующие характерные области поглощения:

1) 3200-3500 см^{-1} - валентные колебания гидроксильных групп (-ОН). Различное количество и пространственное расположение этих групп в исследуемых молекулах приводит к смещению полос поглощения в спектрах фенольных фито-метаболитов как в коротковолновую (синюю), так и в длинноволновую (красную) область относительно друг друга;

2) 2950-2850 см^{-1} - валентные колебания метильных ($-\text{CH}_3$ -), метиленовых ($-\text{CH}_2$ -) и метиновых ($-\text{CH}$ -) групп, в т. ч. входящих в ароматические кольца;

3) ~ 1700 - 1550 см^{-1} - деформационные колебания связей C-C в ароматических кольцах и валентные колебания карбонильных групп $\nu(\text{C}=\text{O})$;

4) 1600-1450 см^{-1} - маятниковые и вилочковые колебания метильных и алифатических групп ($-\text{CH}$ -, $-\text{CH}_2$ -);

5) ниже 1400 см^{-1} - сложные колебания углеродного скелета с дополнительными вкладами деформационных колебаний гидроксильных групп $\delta(-\text{OH})$, крутильных колебаний метильных групп $\delta(-\text{CH}_3)$ и плоскостных деформационных колебаний с участием $-(\text{CH})_n$ - и $-\text{OH}$ групп.

2.2.2 Моделирование взаимодействия между фенольными соединениями, антибиотиком и бактериальными белками-мишенями

Для изучения специфики воздействия фенольных фитометаболитов применяли методы квантовой химии. Предполагается, что в среде могут формироваться межмолекулярные, либо молекулярные комплексы.

Частичное подтверждение этой гипотезы возможно на основе анализа распределения электронной плотности на атомах и электростатического потенциала молекул. Области с высоким отрицательным потенциалом, ассоциированные с наличием гидроксильных ($-\text{OH}$) или карбонильных ($\text{C}=\text{O}$) групп, выступают в роли электрофильных центров. В свою очередь, молекула или её отдельный участок может проявлять нуклеофильные свойства.

Распределение зарядов, характерное для исследуемых молекул, способствует формированию межмолекулярных комплексов между фенольными соединениями и антибиотиками за счёт электростатических взаимодействий.

Методика исследования включала следующие этапы:

1) Оптимизация геометрии молекул. Молекулы исследуемых веществ оптимизировали в приближении HF/3-21+G, дополнительно решали термодинамическую задачу.

2) Конфигурационный поиск. Проводили поиск устойчивых конформаций молекул.

3) Молекулярный докинг. Выполняли моделирование связывания лигандов (исследуемых веществ) с молекулами белков с использованием программного обеспечения AutoDock 4.2.6.

В результате моделирования идентифицировали несколько наиболее вероятных сайтов связывания.

В качестве лигандов для моделирования молекулярного докинга были выбраны следующие соединения: кверцетин, рутин и галловая кислота. Для верификации выбранной теоретической расчётной модели использовали антибиотик цефтазидим.

Проводился анализ связывания лигандов с 3 белками, отобранными из базы данных RCSB Protein Data Bank (PDB), относящимися к двум различным классам ферментов (Sainsbury et al., 2011; Fröhlich et al. 2021; Pandey et al. 2023).

Перед моделированием из белков удалялась вода, восстанавливались неполярные водородные атомы, устанавливался заряд. Размер сетки включал белок и лиганд целиком. Использовался генетический алгоритм Ламарка с количеством запусков равным 50, размер популяции 300, максимальное количество оценок энергии - долгое от 25000000, остальные параметры по умолчанию (Пратама и др., 2020).

Для наглядности и удобства идентификации сайтов связывания проводилась кластеризация исследуемых белков.

Участки с наибольшим количеством пространственных конформаций выделялись в отдельные кластеры. Всего для каждого из белков было выделено по 5 кластеров. Вероятность связывания оценивали по нескольким критериям (рисунок 2.4):

Количество необъединенных, индивидуальных сайтов (кластеров) связывания (N) для каждого вещества

Меньшее их количество указывает на пучность, большее – на разброс по поверхности. Большой разброс точек говорит о плохой аффинности вещества по отношению к белку.

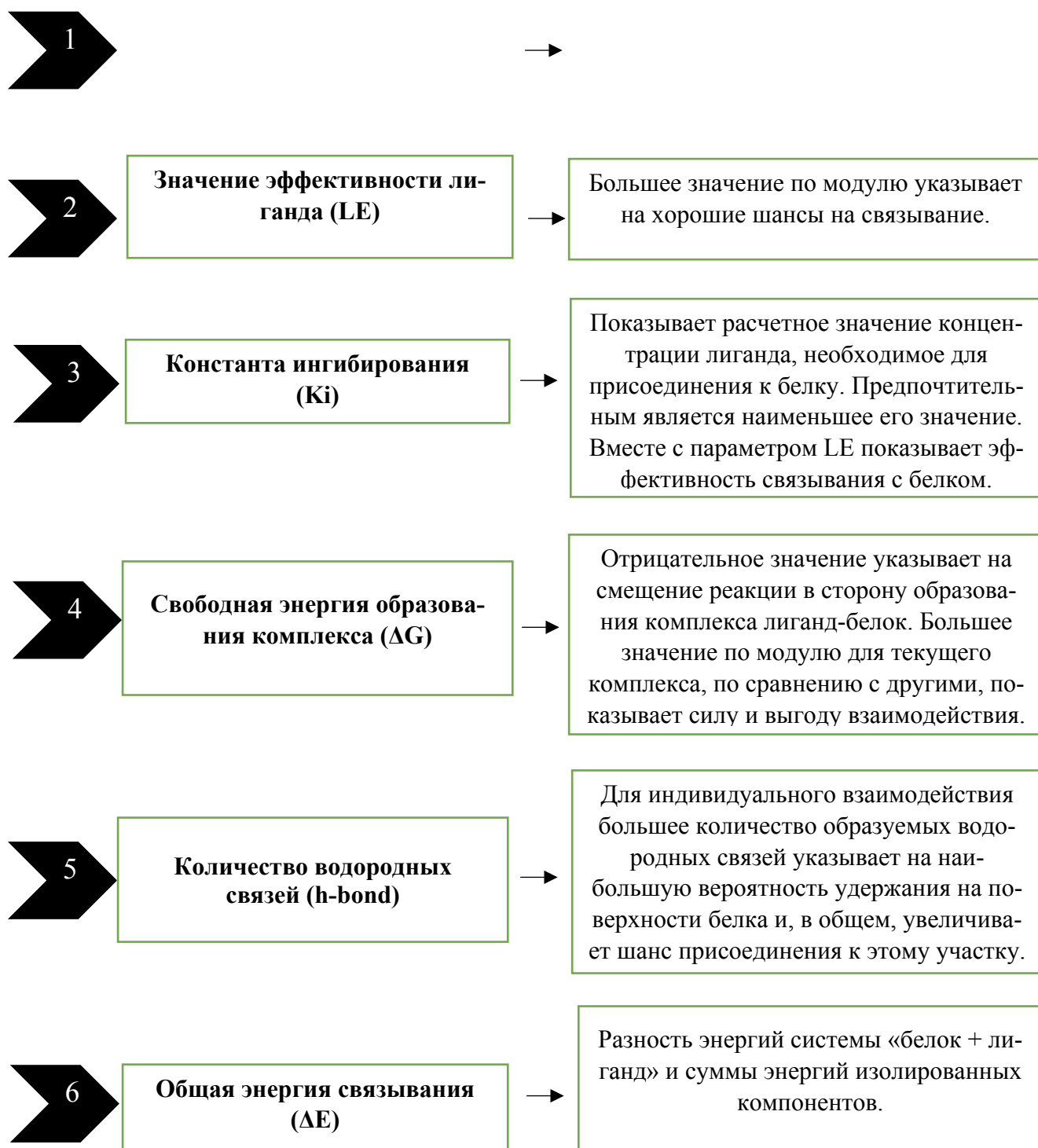


Рисунок 2.4 - Критерии оценки вероятности связывания

Для более детальной интерпретации результатов, у молекул белков, после визуализации расчетов, были выделены пять кластеров. Кластером называли совокупность сайтов связывания на поверхности белка, ограниченного некоторыми размерами и в сумме имеющего наибольшее количество точек связывания, и обладающего, в большинстве случаев, наименьшей средней свободной энергией.

2.2.3 Тестирование на присутствие β -лактамаз

Выработку β -лактамаз устанавливали с помощью наборов для обнаружения β -лактамаз. (Быстрый тест БЕТА ЛАКТАМАЗА СТИКС (BETA LACTAMASE STICKS) для определения β -лактомаз, Liofilmchem, 30 тестов, Италия).

Принцип метода:

Нитроцефин представляет собой хромогенный цефалоспорин (3-(2,4-динитростирл)-6R,7R)-7-(2тиенилацетамидо)-цеф-3-эм-4-карбоновая кислота, Е-изомер), который быстро меняет цвет с желтого на красный по мере образования амидной связи в β -лактамном кольце, гидролизуемом β -лактамазами. Нитроцефин чувствителен к гидролизу всеми известными лактамазами, продуцируемыми микроорганизмами.

Процедура теста:

1. Упаковку с полосками доставали из морозильной камеры и доводили до комнатной температуры.
2. Стерильной петлей отбирались хорошо изолированные колонии со среды для первичного культивирования и штрихом наносились на участок полоски, указанный стрелками.
3. Тест-полоска помещалась в перевернутую чашку. Участок полоски с нанесенной бактериальной культурой, должен располагаться между крышкой и основанием чашки. Для реакции требуется влага, поэтому полоска увлажнялась.

Оценка результатов проводилась по появлению розово-красного окрашивания. Исходя из изменения окраски реакционной смеси с жёлтой на красную (рисунок 2.5) можно судить о гидролизе β -лактамного кольца нитроцефина β -лактамазами в случае со штаммами *S. aureus* ATCC 29213 и *P. aeruginosa* ATCC 27853. Это свидетельствует о продуцировании данными штаммами β -лактамаз.

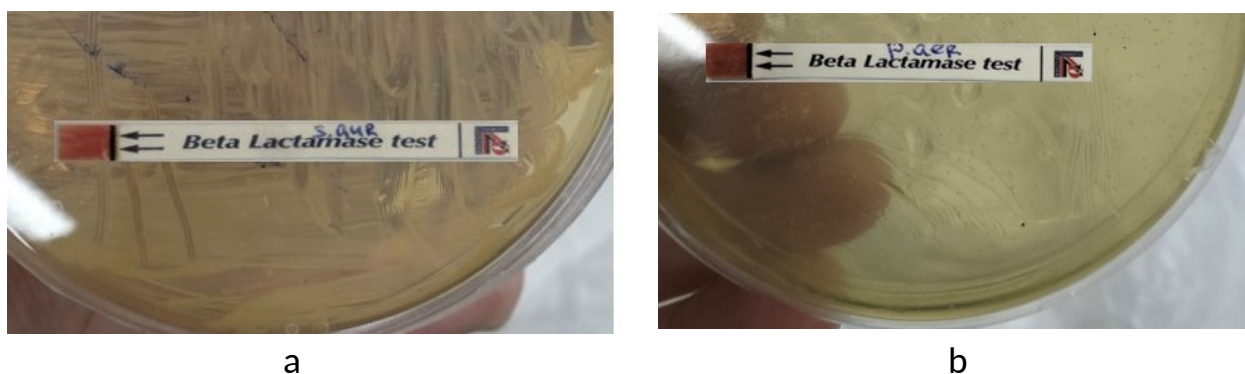


Рисунок 2.5 - Определение выработки β -лактамаз: а) - *S. aureus* ATCC 29213; б) - *P. aeruginosa* ATCC 27853

2.2.4 Оценка антибактериального действия исследуемых веществ в отношении микроорганизмов с применением диффузионного метода агаровых лунок

Данный метод применялся для оценки индивидуальных, аддитивных и антагонистических эффектов противомикробного действия фенольных фитометаболитов и антибиотика в отношении исследуемых микроорганизмов. Принципиальная схема диффузионного метода агаровых лунок состояла в следующих действиях:

- из чистых культур исследуемых микроорганизмов готовили суспензии;
- в чистые чашки Петри с питательной средой вносили по 135 мкл суспензии исследуемых микроорганизмов, далее проводили засеивание «сплошным газоном» при помощи шпателя Дригальского;
- используя пробойник, вырезали 7 лунок по всей площади питательной среды;
- в лунки поочередно вносили по 30 мкл анализируемого антибактериального вещества с определенной концентрацией;
- проводили культивирование в термостате при 37⁰С в течении суток;
- оценивали ингибирование роста микроорганизмов визуально, путём измерения диаметра зоны подавления роста.

Разведение концентраций антибактериальных веществ проводилось следующим образом. В первую пробирку вносили 5 мл дистиллированной воды, в остальные по 2,5 мл. Затем в первую пробирку добавляли необходимо количество исследуемого вещества, растворяли и хорошо перемешивали. Из первой пробирки переносили половину объема во вторую, из второй в третью и т.д. В итоге получалась серия разведений в каждой пробирке с двукратно убывающей концентрацией.

Определение минимальной ингибирующей концентрации цефтазидима и фенольных фитометаболитов в отношении штаммов *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *S.aureus* ATCC 29213 выполняли согласно требованиям стандарта ГОСТ Р ИСО 20776-1-2022 «Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод микроразведений в бульоне для лабораторного исследования активности антимикробных агентов по отношению к быстрорастущим аэробным бактериям, вызывающим инфекционные заболевания».

2.2.5 Статистическая обработка и анализ данных

В ходе работы была проведена статистическая обработка и анализ данных, полученных при исследовании четырёх веществ: антибиотика цефтазидима и трёх фенольных фитометаболитов - галловой кислоты, кверцетина и рутина. Для каждого вещества имелось по 50 измерений по шести показателям, характеризующим эффективность взаимодействия с белком-мишенью.

На первом этапе были рассчитаны средние значения и показатели разброса для каждого вещества, построены графики распределения (ящики с усами), позволившие визуально оценить характер данных и предварительные различия между веществами.

С помощью многомерного дисперсионного анализа (MANOVA) было установлено, что вещества статистически значимо различаются по всему комплексу показателей. Далее с использованием одномерных дисперсионных комплексов и

апостериорных тестов были детально проанализированы различия по каждому показателю в отдельности и проведены попарные сравнения веществ.

Выполнен анализ распределения измерений по кластерам внутри каждого вещества, что позволило оценить, насколько стабильна ориентация молекулы при связывании и существуют ли предпочтительные положения в активном центре.

С помощью метода главных компонент была построена многомерная визуализация данных, наглядно демонстрирующая группировку веществ и подтверждающая результаты статистических тестов.

Построены множественные регрессионные модели, позволившие количественно оценить, насколько каждое вещество превосходит или уступает цефтазидиму по термодинамическим показателям и количеству водородных связей, выбранному в качестве базового для сравнения.

На заключительном этапе проведён QSAR-анализ, в ходе которого с использованием молекулярных дескрипторов из базы данных PubChem была исследована связь между химическим строением веществ и их биологической активностью.

Заключение к главе материалы и методы исследования

В исследовании применяли многоуровневый подход к изучению взаимодействия цефтазидима с фенольными фитометаболитами - кверцетином, галловой кислотой и рутином.

В качестве объектов использовали референтные штаммы *S. aureus* ATCC 29213 и *P. aeruginosa* ATCC 27853, а также три белка-мишени из двух функциональных классов ферментов - PBP3, PC1 (BlaZ) и OXA-10.

Экспериментальную часть составили микробиологические методы (агаровые лунки, микроразведения, тесты на β -лактамазы) и физико-химический анализ (ИК-Фурье спектроскопия) для оценки антибактериальной активности веществ и выявления молекулярных комплексов.

Теоретический блок включал квантово-химические расчёты и молекулярный докинг, позволившие определить вероятные сайты связывания и термодинамические параметры взаимодействий.

Статистическую обработку данных выполнили с помощью MANOVA, метода главных компонент, регрессионного и QSAR-анализа, что позволило надёжно сопоставить структуру соединений с их биологической активностью.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Анализ формирования межмолекулярного взаимодействия комплексов цефтазидима с фенольными фитометаболитами

Для изучения воздействия фенольных фитометаболитов и антибиотика (цефтазидима) на белковые структуры пептидогликана бактериальной клетки и оценки вероятности такого воздействия были задействованы методы квантовой химии. Одним из предполагаемых механизмов является образование в среде межмолекулярных либо молекулярных комплексов между фенольными фитометаболитами и цефтазидимом.

Косвенным подтверждением этой гипотезы может служить анализ распределения электронной плотности на атомах и электростатического потенциала. Известно, что участки молекулы с выраженным отрицательным потенциалом, обусловленным наличием гидроксильных или карбонильных групп, могут функционировать как электрофильные центры, в то время как остальная часть молекулы или вся молекула целиком проявляет нуклеофильные свойства (Реутов, 2023; Травень, 2024).

Предполагается, что за счёт электростатических сил между молекулами фенольных фитометаболитов и антибиотика формируется межмолекулярный комплекс.

Исследование проводилось в два этапа. На первом этапе выполняли оптимизацию геометрии молекул фенольных фитометаболитов и антибиотика в приближении HF/3-21G, а также рассчитывали матрицу вторых производных.

Эти данные оказались достаточными для определения структуры химических соединений. На втором этапе применяли более сложное вычислительное приближение. Итогом работы стали построенные на основе полученных результатов карты электростатических потенциалов и электронной плотности.

Рисунок 3.1 демонстрирует результаты квантово-химического моделирования: карты молекулярно-электростатического потенциала (МЭП) и пространственного распределения электронной плотности молекул цефтазидима, а также фенольных фитометаболитов - кверцетина, рутина и галловой кислоты. Красным пока-

заны зоны положительного электростатического потенциала, розовым - отрицательного. Сферами указано распределение электронной плотности по молекуле.

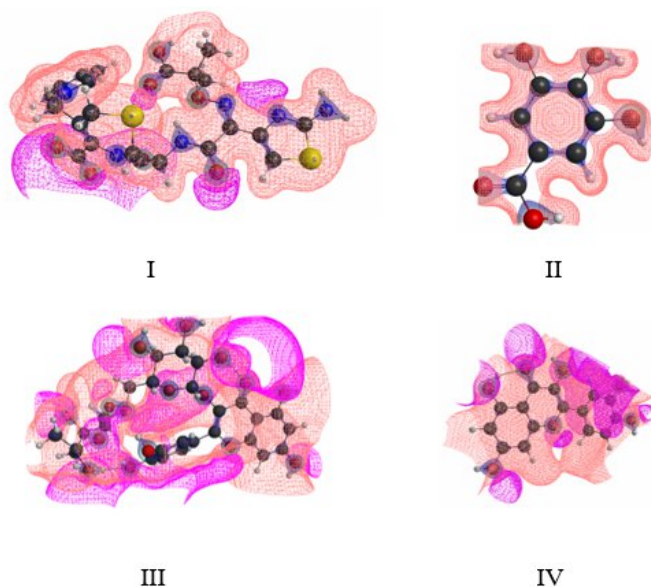


Рисунок 3.1 - Молекулярно-электростатический потенциал и распределение электронной плотности (I - цефтазидим; II - галловая кислота, III - рутин, IV- кверцетин). Черным цветом представлены атомы углерода (C), красным - кислород (O₂), белым - водород (H₂), желтым - сера (S).

На основании визуализации карт молекулярно-электростатического потенциала (МЭП) установлено, что все соединения, за исключением галловой кислоты обладают способностью выступать в роли как электрофилов, так и нуклеофилов. Наибольшая концентрация электронной плотности наблюдается на атомах кислорода и азота; в ряде случаев отмечается её делокализация по системе ароматического кольца. При этом области отрицательного электростатического потенциала в основном локализованы в окрестностях гидроксильных функциональных групп, что указывает на их потенциальную реакционную активность в процессах межмолекулярного взаимодействия (Плотникова Ю.А. и др., 2023).

Анализ карт молекулярно-электростатического потенциала (МЭП) показал, что в молекуле рутина ключевые электрофильные центры сосредоточены в зоне расположения гидроксильных групп, локализованных на неароматических гексациклических участках структуры. В отличие от рутина, остальные соединения в

рамках проведённого моделирования не демонстрируют значимых нуклеофильных характеристик.

3.2 Молекулярное моделирование взаимодействий цефтазидима и фенольных фитометаболитов с бактериальными белками-мишенями

Моделирование взаимодействий цефтазидима и фенольных фитометаболитов осуществлялось с использованием трёх белковых структур из базы данных RCSB Protein Data Bank. Указанные белки принадлежат к двум функционально значимым классам ферментов, вовлечённых в устойчивость к β -лактамным антибиотикам: β -лактамазам и PBP (Chen et al., 1993; Sainsbury et al., 2011; Fröhlich et al. 2021; Pandey et al. 2023).

Проведённое моделирование с целью локализации сайта связывания продемонстрировало хорошее соответствие с экспериментальными данными рентгеноструктурного анализа, депонированными в базе Protein Data Bank. Наблюдаемое совпадение подтверждает надёжность и воспроизводимость предсказаний, полученных с использованием выбранной расчётной модели (Плотникова и др., 2026).

3.2.1 Оценка аффинности исследуемых соединений к PBP 3

В таблицах Приложения A1 (a, b, c, d) приведены значения свободной энергии образования комплекса (ΔG), константы ингибирования (K_i), количества водородных связей (h-bond), эффективности лиганда (LE), общей энергии связывания (ΔE) и номер кластера для комплексов PBP 3 с цефтазидимом, кверцетином, галловой кислотой и рутином соответственно.

С использованием данных базы PDB был установлен активный центр для PBP 3, который находится в I кластере.

Согласно результатов молекулярного докинга наибольшее количество конформационных связываний для кверцетина приходится на I (кластер с активным сайтом) и III кластеры. Это может свидетельствовать о структурной гибкости квер-

цетина и способности адаптироваться к топологии связывающего кармана (Плотникова и др., 2023).

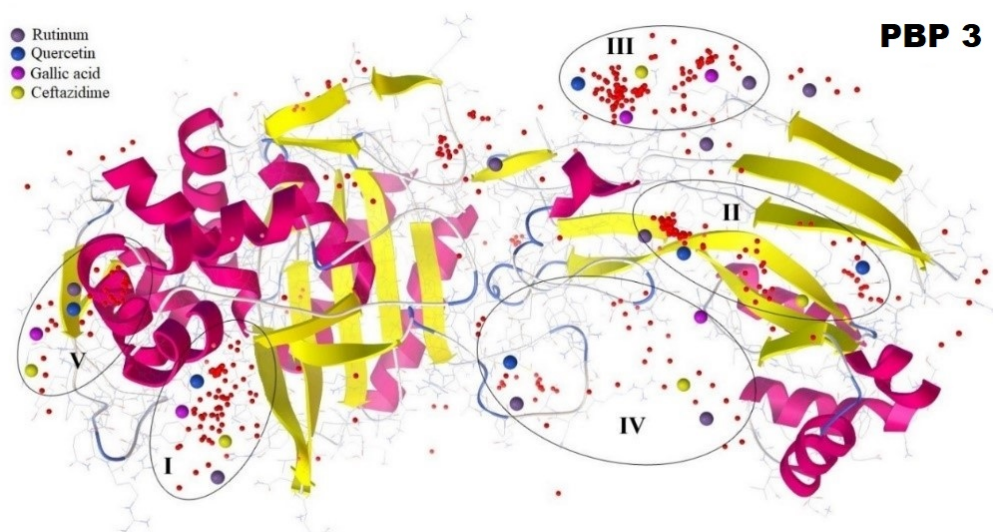


Рисунок 3.2 - Кластеры взаимодействия с РВР 3

Идентифицированные количественные характеристики кверцетина подтверждают высокую аффинность к РВР 3. Так высокие (по модулю) средние значения свободной энергии образования комплекса (ΔG среднее) свидетельствуют о термодинамической выгодности взаимодействия. В среднем в конформациях отмечается 4-5 водородных связей, обеспеченных π-π взаимодействиями, характеризующиеся низкими средними значениями константы ингибирования (K_i среднее), что также указывает на вероятность высокой степени ингибирования целевой молекулы.

Образование водородных связей фиксируется с остатками таких аминокислот, как Asn, Arg и Ser. (рисунок 3.3).

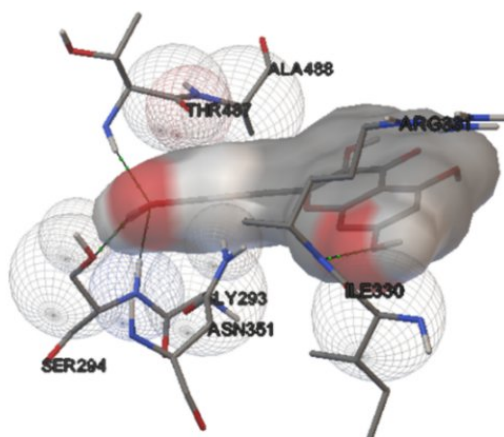


Рисунок 3.3 – Конформационный вариант взаимодействия РВР 3 с кверцетином

С локализуемым в активном сайте белка остатком Ser кверцетин образует 3 водородных связи, в том числе одну через аминогруппу и 2 через группу радикала, что подчеркивает важность его роли в стабилизации комплекса «белок-лиганд».

В отличие от кверцетина, рутин характеризуется низкими шансами на связывание с белковой мишенью (рисунок 3.4 (а)).

Это объясняется малым количеством конформационных водородных связей (в среднем 1 – 2 связи), высокими значениями константы ингибирования (K_i) и положительными значениями энергии образования комплекса ($\Delta G > 0$). Такие параметры свидетельствуют о термодинамической невыгодности и невозможности образования устойчивого белок-лигандного комплекса.

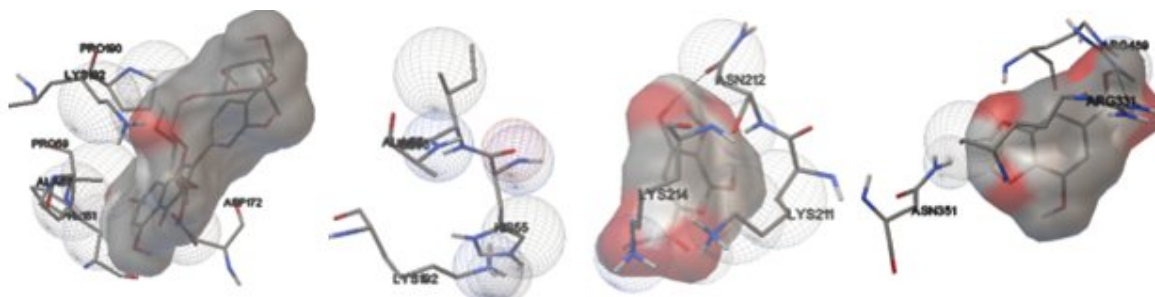


Рисунок 3.4 - *a)* - Взаимодействие РВР 3 с рутином; *b)* - Взаимодействие РВР 3 с цефтазидимом; *c)* - Взаимодействие РВР 3 с галловой кислотой (46 комбинаций); *d)* - Взаимодействие РВР 3 с галловой кислотой (в активном I кластере)

Наибольшее количество конформаций у цефтазидима отмечено в III кластере РВР 3 (рисунок 3.4(b)), здесь также фиксируются высокие значения энергии образования комплекса с формированием единственной в большинстве конформаций, водородной связи.

Для галловой кислоты характерно компактное распределение конформаций в пределах III кластера, сочетающееся с низкими значениями константы ингибирования (K_i), двумя (в среднем) водородными связями, с такими аминокислотны-

ми остатками, как Asn и Lys при максимальном значении общей энергии связывания ΔE (рисунок 3.4 (с)).

Роль количества водородных связей в стабилизации белок-лигандного комплекса нельзя недооценивать. Их малое количество или же отсутствие снижает вероятность связывания даже при благоприятных значениях свободной энергии образования комплекса (ΔG) и низких значениях константы ингибирования (K_i). С учетом всех критериев оценки, наилучшие показатели связывания с РВР 3 продемонстрировали кверцетин и цефтазидим.

Исходя из вышесказанного, ранжирование соединений по убыванию аффинности связывания с РВР 3 будет следующим: кверцетин > галловая кислота > рутин (цефтазидим выбран в качестве сравнения).

3.2.2 Оценка аффинности исследуемых соединений к BlaZ

Взаимодействие β -лактамазы BlaZ с антибактериальными агентами определяются особенностями ее структуры. С цефтазидимом она формирует эфирный комплекс с участием остатка Ser, который локализуется в области активного центра центра (V кластер; рисунок 3.5).

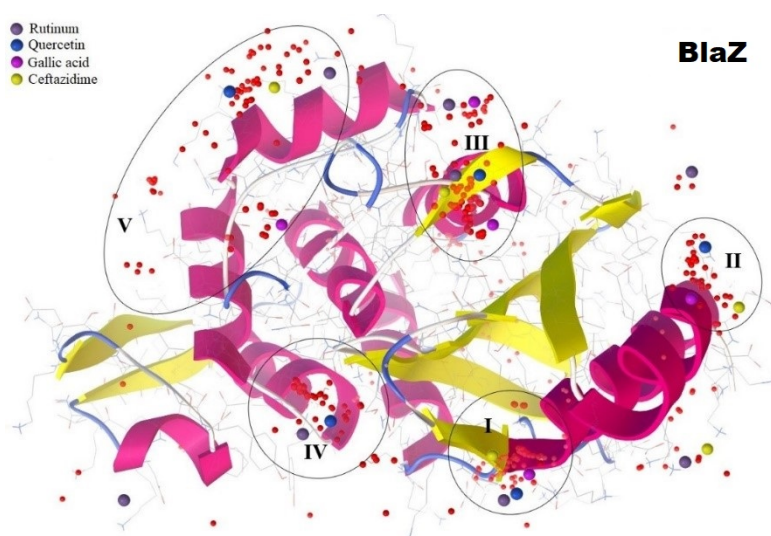


Рисунок 3.5 - Кластеры взаимодействия с BlaZ

Расщепление эфирного комплекса сопровождается высвобождением функционально активного фермента и модифицированного субстрата.

Значения свободных энергий образования комплекса (ΔG), констант ингибирования (K_i), количества водородных связей (h-bond), эффективности лиганда (LE), общей энергии связывания (ΔE), рассчитанных для β -лактамазы BlaZ представлены в Приложении A2 (a, b, c, d)).

Для цефтазидима наибольшее количество конформаций и благоприятные показатели эффективности взаимодействия с β -лактамазой BlaZ отмечаются в V кластере, где находится активный центр фермента (рисунок 3.5). Здесь фиксируется 35 из 50 анализируемых нами конформаций, с максимальным значением энергии образования комплекса $\Delta G = -8,58$ kcal/mol. Стабилизация комплекса осуществляется за счёт пяти водородных связей с такими аминокислотными остатками, как Asn и Lys (рисунок 3.6).

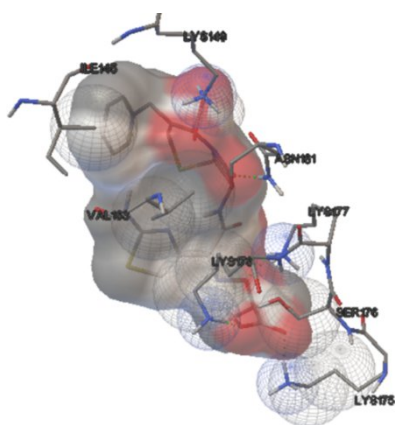


Рисунок 3.6 - Конформации цефтазидима с BlaZ по max ΔG

Для галловой кислоты отмечена высокая степень аффинности к β -лактамазе BlaZ преимущественно в III кластере. Это подтверждается комплексом биохимических и структурно-энергетических показателей. Так, молекулярный докинг выявил 31 конформацию с минимальной свободной энергией образования комплекса $\Delta G = -6,15$ kcal/mol, низкими значениями константы ингибирования ($K_i = 31,15$ мкМ). Дополнительно отмечается формирование не менее четырёх водородных связей в стабильных конформациях. В частности, для конформации 34 (рисунок

3.7 (а)) зафиксировано образование четырёх водородных связей с участием следующих аминокислотных остатков: Asn196, Gly197 (две комбинации) и Lys205.

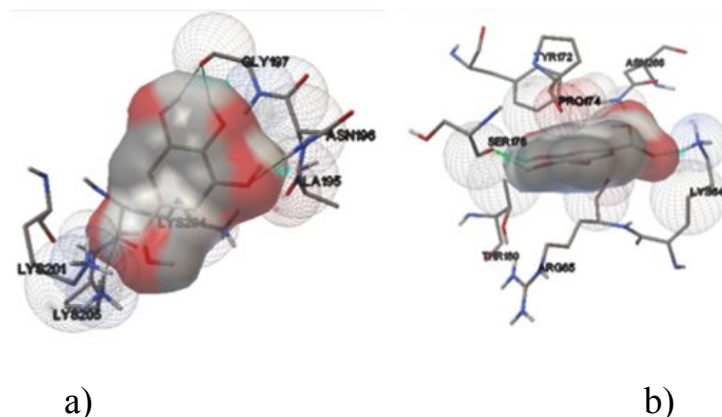


Рисунок 3.7 - а) - Взаимодействие белка BlaZ с галловой кислотой в максимуме ΔG , III кластер; б) - Взаимодействие белка BlaZ с галловой кислотой по DL-Serine, III кластер

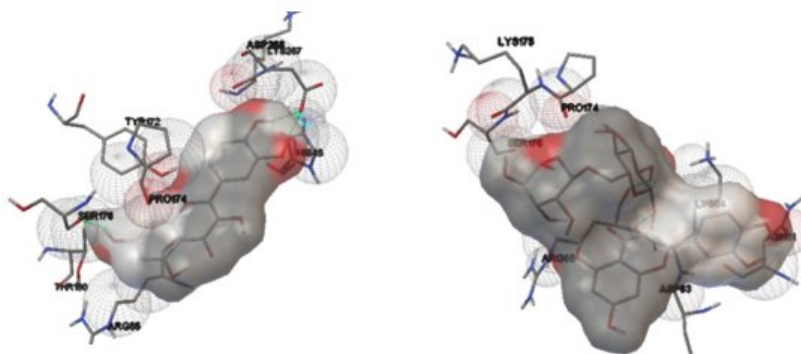
Взаимодействие DL-Serine в III кластере с β -лактамазой BlaZ реализуется в рамках конформации 35 (рисунок 3.7(б)) и характеризуется следующими параметрами: свободная энергия образования комплекса $\Delta G = -4,65$ kcal/mol, константа ингибирования $K_i = 391,03$ мкМ, а также образованием трёх водородных связей с участием аминокислотных остатков Lys64 и Ser176.

При этом отмечено отсутствие значимых взаимодействий между цефтазидимом и галловой кислотой с ферментом BlaZ в IV кластере. Высокая численность конформаций в V кластере (для цефтазидима) и в III кластере (для галловой кислоты), наряду с благоприятными значениями ΔG и K_i , говорит о высокой вероятности эффективного молекулярного связывания данных соединений с соответствующими участками белка.

Конформации кверцетина с β -лактамазой BlaZ распределены по всем пяти кластерам с наименьшей плотностью взаимодействий в V кластере (совпадающим с активным центром). При этом взаимодействия в V кластере характеризуются высокими значениями ΔG , низкими K_i и множественными водородными связями.

Максимальная активность кверцетина в отношении BlaZ зафиксирована в III кластере: $\Delta G = -6,4$ kcal/mol, 15 конформаций, $K_i = 20,52$ мкМ (рисунок 3.8 (а)).

Основные участники связывания - Asp268 и Asn266, с вовлечением DL-Serine (4 комбинации с Asp268 и 48 с Asn266).



a)

b)

Рисунок 3.8 - а) - Взаимодействие BlaZ с кверцетином в III кластере; б) - Взаимодействие BlaZ с рутином в максимуме ΔG , III кластер.

В ходе молекулярного докинга рутина с ферментом BlaZ выявлено отсутствие значимых взаимодействий во II кластере. Наибольшая конформационная активность соединения зафиксирована в III кластере, что подтверждается следующими количественными показателями:

- 1) количество конформаций - 19;
- 2) свободная энергия связывания: $\Delta G = -4,53$ kcal/mol (максимальное значение среди всех кластеров);
- 3) константа ингибирования: $K_i = 478,33$ мкМ (минимальное значение; рисунок 34(b)).

Структурный анализ показал, что взаимодействие в III кластере преимущественно опосредовано аминокислотным остатком Arg65. Примечательно, что в различных конформациях данный остаток выступает как донором протонов, так и акцептором кислорода, участвуя в формировании водородных связей.

Комплексная оценка параметров взаимодействия всех исследуемых соединений с BlaZ (включая средние значения ΔG , количество водородных связей (h-bond), средние значения K_i , показатели лигандной эффективности (LE) и изменения энергии (ΔE) выявила общую тенденцию к эффективному межмолекулярному

связыванию. Наибольшую активность продемонстрировали цефтазидим и кверцетин, что подтверждается их высокими средними значениями ΔG и низкими K_i .

3.2.3 Оценка аффинности исследуемых соединений к ОХА-10

В Приложении А3 (a, b, c, d) приведены значения свободной энергии образования комплекса (ΔG), константы ингибирования (K_i), количества водородных связей (h-bond), эффективности лиганда (LE), общей энергии связывания (ΔE) и номер кластера для β -лактамазы ОХА-10 с цефтазидимом, кверцетином, галловой кислотой и рутином.

Для ОХА-10 был установлен активный центр, приходящийся на аминокислоту Ser47 по базе данных PDB и сформирована карта разделения по кластерам (рисунок 3.9).

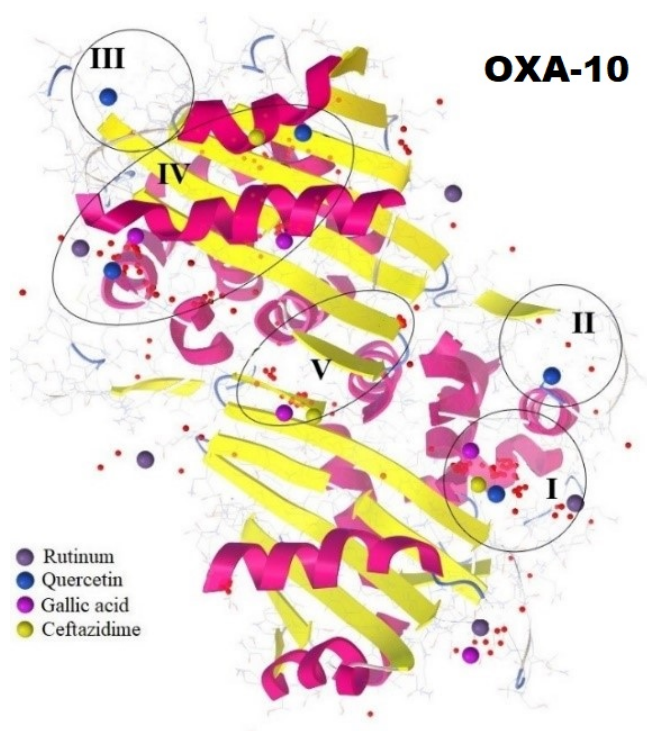


Рисунок 3.9 - Кластеры взаимодействия для белка ОХА-10

Анализ 50 возможных конформаций связывания с цефтазидимом свидетельствует о перспективности межмолекулярного взаимодействия, что подтвер-

ждается термодинамическими параметрами ΔG и значениями константы ингибирования K_i .

В частности, в кластере IV β -лактамазы OXA-10 (рисунок 3.10 (a)) зафиксирован максимальный показатель свободной энергии образования комплекса ($\Delta G = -4,39$ kcal/mol) при формировании одной водородной связи с аминокислотным остатком Lys70. В кластере V (рисунок 3.10(b)) наблюдается образование двух водородных связей с аминокислотными остатками Glu199 и Ser115, при этом $\Delta G = -2,8$ kcal/mol, а $K_i = 8820$ μ M.

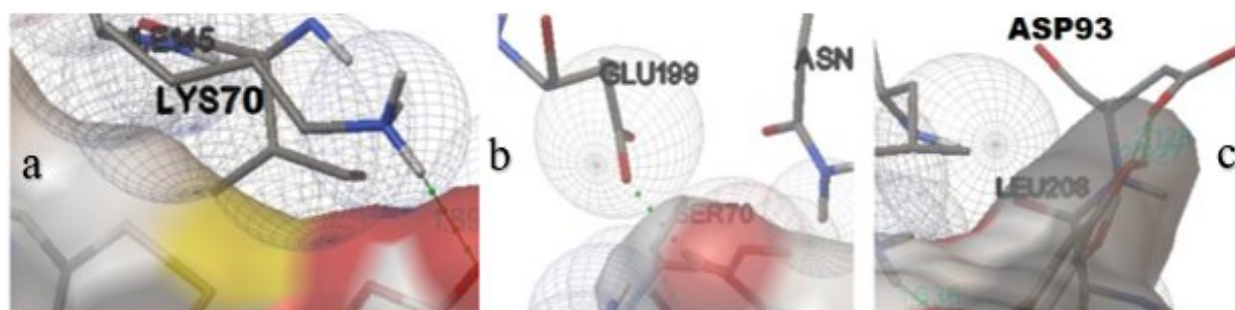


Рисунок 3.10- а) - Взаимодействие OXA-10 с цефтазидимом в IV кластере; б) - Взаимодействие OXA-10 с цефтазидимом в V кластере; в) - Взаимодействие OXA-10 с кверцетином во II кластере

При возникновении взаимодействий β -лактамазы OXA-10 с кверцетином отмечаются достаточно высокие значения ΔG во всех конформациях, с учетом низких значений K_i и наличием 2-3 водородных связей в большинстве конформаций можно сделать заключение о хороших шансах на связывание. Так, например, в одной из комбинаций, наблюдается возникновение 3 водородных связей по аминокислотам Asp93, Pro118, Arg125 (рисунок 3.10(с)). При этом фиксируются значения ΔG (-4,36 kcal/mol), K_i (639,01 μ M).

3.3 Анализ образования водородных связей фенольных фитометаболитов и цефтазидима с аминокислотами белков-мишеней

Водородные связи, формируемые между фенольными фитометаболитами и аминокислотными остатками белка, играют существенную роль в определении их структурно-функциональных характеристик. Данные взаимодействия возникают вследствие электростатического притяжения между атомом водорода одной молекулы, связанным с электроотрицательным атомом, и высокоэлектроотрицательным атомом (например, кислородом или азотом) другой молекулы. Различают межмолекулярные водородные связи (образующиеся между различными молекулами) и внутримолекулярные (локализованные в пределах одной молекулы).

Наличие водородных связей оказывает значительное влияние на физико-химические свойства соединений, повышая температуры кипения и плавления, а также взаимную растворимость веществ. В контексте белок-лигандных взаимодействий водородные связи обеспечивают связывание и стабилизацию молекул на поверхности белка. Соответственно, их отсутствие или недостаточное количество, даже при благоприятных значениях свободной энергии взаимодействия, может служить индикатором невозможности эффективного присоединения фитометаболита к молекуле белка.

Результаты моделирования межмолекулярных взаимодействий продемонстрировали наличие характерных закономерностей в формировании водородных связей между аминокислотными остатками, входящими в состав РВР и β -лактамаз и лигандами. Установлено, что вероятность и геометрия образования водородных связей существенно варьируются в зависимости от структурных и физико-химических свойств контактирующего лиганда, а также от типа аминокислотного остатка, участвующего во взаимодействии.

3.3.1 Характеристика возникновения водородных связей между цефтазидимом и аминокислотами белков-мишеней

Механизм антибактериального действия цефтазидима основан на его способности ацетилировать активные центры мембраносвязывающих транспептидаз - ферментов, катализирующих перекрёстную сшивку цепей пептидогликана.

Нарушение данного процесса препятствует формированию прочной и ригидной структуры клеточной стенки, что ведёт к дестабилизации бактериальной клетки и её последующей гибели.

Дополнительным фактором стабилизации взаимодействия между цефтазидимом и белком-мишенью выступает образование водородных связей с участием отдельных аминокислотных остатков активного центра. Эти нековалентные взаимодействия повышают аффинность связывания и способствуют эффективному подавлению функциональной активности фермента.

Для цефтазидима характерно наиболее частое возникновение водородных связей с такими аминокислотами как Lys, Arg, Ala, Glu, Asp, Asn. При этом возникновение водородных связей с лизином наблюдается как у РВР 3, так и у β -лактамаз. Меняется лишь область взаимодействия. Так для Lys характерно участие в связывании как группы радикала (рисунок 3.11 (a)), так и карбоксильной (рисунок 3.11 (b)) и аминогруппы аминокислоты (рисунок 3.11 (c)).

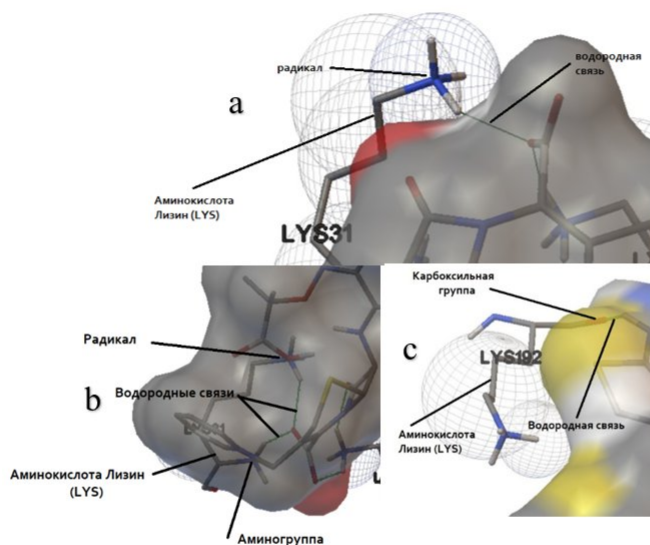


Рисунок 3.11 - а) - Образование водородных связей у цефтазидима и Lys в положении группы радикала; б) - Образование водородных связей у цефтазидима и Lys в позиции радикала и аминогруппы; с) - Образование водородных связей у цефтазидима и Lys в позиции карбоксильной группы

Arg - 2-амино-5-гуанидинпентановая кислота относится к α -аминокислотам, поскольку содержит α -аминогруппу ($-\text{NH}_2$) и карбоксильную группу ($-\text{COOH}$),

связанные с α -углеродным атомом. Боковая цепь аргинина включает гуанидиновую группу ($-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$), локализованную на δ -углероде. Благодаря высокой основности ($\text{pK}_a \approx 12,48$) гуанидиновая группа при физиологическом pH преимущественно находится в протонированной катионной форме, что обуславливает способность аргинина участвовать в образовании множественных водородных связей и ионных взаимодействий.

В комплексе с цефтазидимом аргинин формирует водородные связи как через функциональные группы основной цепи (карбоксильный кислород и аминогруппа $-\text{NH}$), так и через атомы гуанидиновой группы радикала (HN11 , HN12 , HN21 , HE), что подтверждается данными молекулярного моделирования (рисунок 3.12).

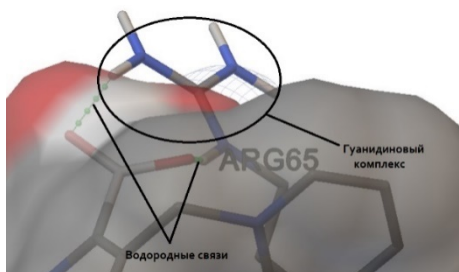


Рисунок 3.12 - Образование водородных связей у цефтазидима с Arg в положении гуанидиновой группы

Asp способна формировать водородные связи за счёт атомов кислорода карбоксильных групп ($-\text{COOH}$) боковой цепи. При физиологических значениях pH (≈ 7.4) карбоксильные группы диссоциируют с образованием карбоксилат-аниона ($-\text{COO}^-$) и протонов (H^+), что придаёт аминокислоте отрицательный заряд и повышает её способность к образованию водородных связей с полярными функциональными группами.

Водородные связи могут возникать как с участием атомов боковой цепи, так и атомов пептидного остова. В частности, при формировании α -спирали наблюдаются водородные связи между атомами кислорода карбонильных групп ($\text{C}=\text{O}$) и атомами азота аминогрупп ($-\text{NH}^-$) через четыре аминокислотных остатка. Кроме того, Asp может участвовать в так называемых вилочковых водородных связях (side-chain to backbone h-bonds) - взаимодействиях между атомами кислорода бо-

ковой цепи и группами Н-Н основной цепи пептида, способствующих стабилизации вторичной структуры белка.

В комплексе с цефтазидимом Asp формирует водородные связи как через карбоксильную группу пептидного остова, так и через карбоксилатную группу радикала, что подтверждается данными молекулярного моделирования (рисунок 3.13).

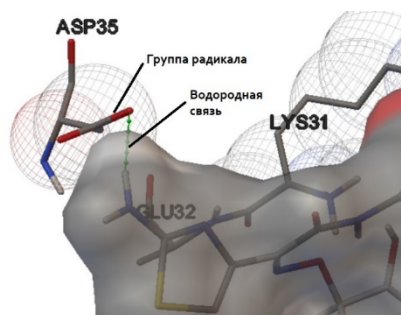


Рисунок 3.13 - Образование водородных связей у цефтазидима с Asp в положении боковой цепи

Asn формирует водородные связи за счёт амидной группы ($-\text{CONH}_2$) в боковой цепи, которая выступает в роли донора и акцептора водородных связей как с полярными функциональными группами других молекул, так и с пептидным остовом. Несмотря на высокую полярность, амидная группа не ионизируется в физиологических условиях.

Остатки аспарагина часто локализуются на терминальных участках полипептидной цепи, а также в областях формирования вторичных структур - α -спиралей и β -листов, что обусловлено их способностью образовывать водородные связи с атомами пептидного остова. Эти взаимодействия повышают гидрофильность аминокислоты и способствуют её растворимости в водной среде.

Таким образом, амидная группа Asn играет ключевую роль в стабилизации межмолекулярных взаимодействий и пространственной организации белковых структур. Пример водородного связывания между Asn и цефтазидимом проиллюстрирован на рисунке 3.14.

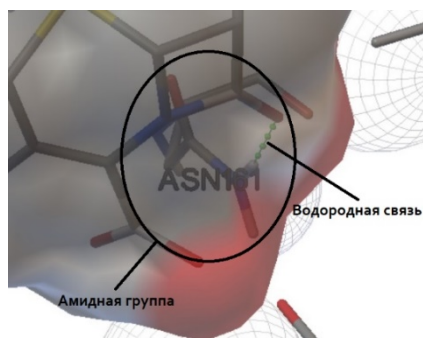


Рисунок 3.14 - Образование водородных связей у цефтазидима с Asn в положении амидной группы

Для цефтазидима характерно образование водородных связей с аминокислотными остатками, в том числе с аланином (Ala) и глутаматом (Glu).

Ala формирует водородные связи посредством взаимодействия атомов водорода с электроотрицательными атомами (кислородом или азотом). Водородная связь возникает между двумя электроотрицательными атомами при участии атома водорода, ковалентно связанного с одним из них. Подобные взаимодействия наблюдаются, в частности, в молекулярных кристаллах.

В димерах Ala энергия стабилизации водородной связи определяется преимущественно геометрическими параметрами, прежде всего межъядерным расстоянием между атомами. Образование связывающей σ -орбитали водородной связи в таких системах обусловлено взаимодействием гибридной орбитали неподелённой электронной пары атома кислорода и разрыхляющей σ^* -орбитали связи N-H.

Glu способен формировать водородные связи за счёт функциональных групп боковой цепи, в первую очередь карбоксильной группы ($-\text{COOH}$). Данная группа может выступать донором водородной связи, тогда как электроотрицательные атомы (например, кислород карбонильной группы) выполняют роль акцепторов.

В физиологическом диапазоне pH карбоксильные группы Glu полностью ионизируются с образованием карбоксилат-аниона ($-\text{COO}^-$), что приводит к возникновению частичного отрицательного заряда на атомах кислорода. Это повышает способность остатка глутамата к образованию водородных связей с полярными функциональными группами и молекулами.

Водородные связи могут формироваться между боковыми радикалами Glu и другими аминокислотными остатками, включая Tyr, Ser и Asn.

3.3.2 Характеристика возникновения водородных связей между кверцетином и аминокислотами белков-мишеней

Проведенная оценка молекулярных взаимодействий между кверцетином и белками-мишенями выявила наиболее часто повторяющиеся взаимодействия с такими аминокислотными остатками как Arg, Asp, Ser и Asn.

Важную роль в формировании водородных связей кверцетина с остатком Ser играет гидроксильная группа -ОН боковой цепи аминокислоты. За счёт высокой полярности –ОН группа может взаимодействовать как с полярными молекулами вне боковой цепи, в том числе участвовать во внутримолекулярных взаимодействиях с другими функциональными группами полипептидной цепи, а также образовывать межостаточные водородные связи с боковыми цепями других аминокислот.

Помимо участия в образовании комплекса –ОН группы боковой цепи аминокислоты (рисунок 3.15 (а)), у кверцетина с Ser образование водородных связей происходит с участием аминогруппы (рисунок 3.15 (b)) и карбоксилонной группы (рисунок 3.15 (c)) пептидного остова.

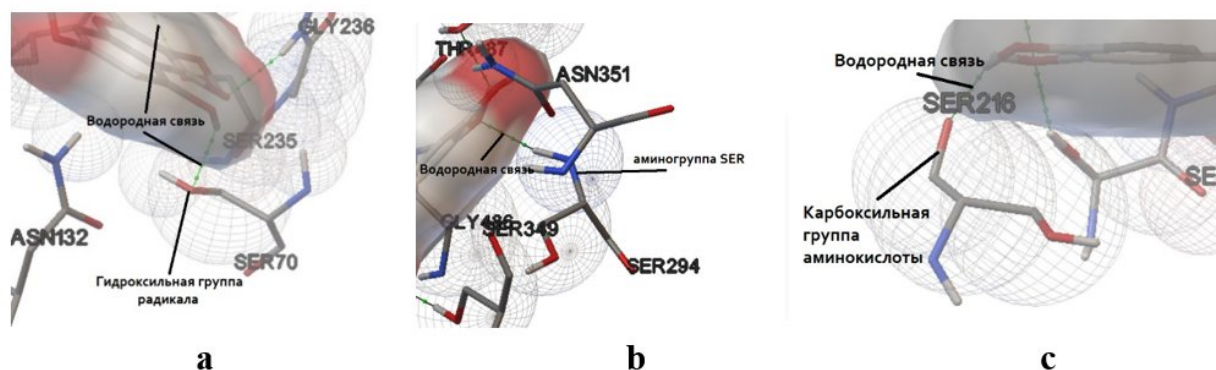


Рисунок 3.15 - Образование водородных связей у кверцетина с Ser: а) - В положении гидроксильной группы радикала; б) - В положении аминогруппы; с) - В положении карбоксильной группы

Эти взаимодействия способствуют стабилизации лиганд-белкового комплекса и определяют специфичность связывания.

При взаимодействии кверцетина с Arg образуются водородные связи в положении карбоксильной, аминогруппы и гуанидиновой группы радикала; с Asp образуются водородные связи в положении карбоксильной, аминогруппы и группы радикала (по кислороду); с Asn образуются водородные связи в положении карбоксильной, аминогруппы и группы радикала.

Варианты образования водородных связей между кверцетином и отмеченными аминокислотами, с учетом распределения донор-акцептор представлены на рисунке 3.16

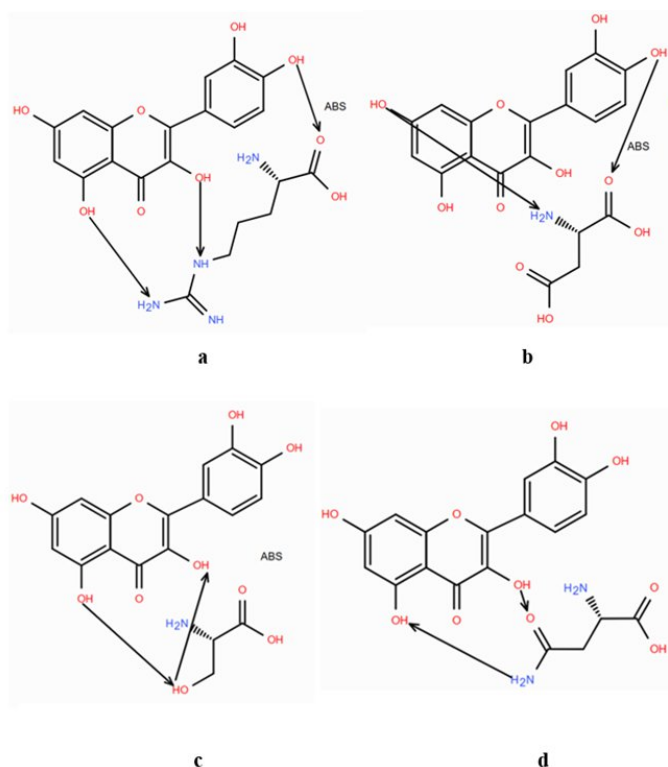


Рисунок 3.16 - Образование водородных связей между кверцетином и: а) - Arg; б) - Asp; с) - Ser; d) - Asn

В комплексе кверцетина и Arg (рисунок 3.16(a)) фенольные гидроксильные группы кверцетина выступают донорами водородной связи, а атомы азота в гуанидиновой группе Arg работают как акцепторы. Похожий принцип у кверцетина с Asp (рисунок 3.16(b)). Гидроксильные группы кверцетина выступают донорами водородной связи, а атомы кислорода в карбоксильных группах ($-\text{COOH}$) Asp работают как акцепторы.

В комплексе кверцетина и Ser (рисунок 3.16(c)) гидроксильная группа Ser является донором. Кислород кверцетина работает как акцептор (у него есть неподелённые электронные пары, которые принимают атом водорода). Другой вариант, когда гидроксильная группа кверцетина является донором, а атом кислорода в боковой цепи Ser ($-\text{CH}_2\text{OH}$) - акцептором.

То есть в такой паре обе гидроксильные группы могут попеременно выступать то донором, то акцептором.

В комплексе между кверцетином и Asn (рисунок 3.16(d)) также возникают несколько возможных водородных связей - гидроксильная группа кверцетина как донор, а кислород карбонила работает как акцептор. И наоборот - амидная группа Asn как донор, а атом кислорода в одной из гидроксильных групп кверцетина - акцептор.

3.3.3 Характеристика возникновения водородных связей между галловой кислотой и аминокислотами белков-мишеней

Для галловой кислоты характерно образование водородных связей с такими аминокислотами как Arg, Asn, Lys и Glu. В образовании связей между галловой кислотой и данными аминокислотами принимают участие как карбоксильная и аминогруппа пептидного остова аминокислот, так и их радикалы (рисунок 3.17).

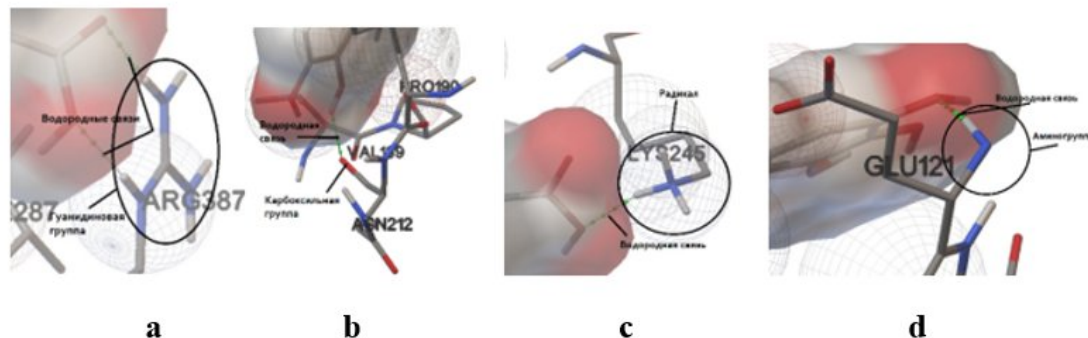


Рисунок 3.17 - Образование водородных связей у галловой кислоты с а) Arg в положении гуанидиновой группы; б) Asn в положении карбоксильной группы пептидного остова; в) Lys в положении амидной группы радикала; д) Glu в положении аминогруппы пептидного остова.

Для галловой кислоты и Lys (рисунок 3.18(a)):

Доноры водородной связи - атомы водорода из -ОН групп галловой кислоты, акцепторы - атомы с неподелёнными электронными парами. В Lys это могут быть: 1) карбонильный кислород ($C=O$) из пептидной связи основной цепи; 2) атомы азота в других частях молекулы.

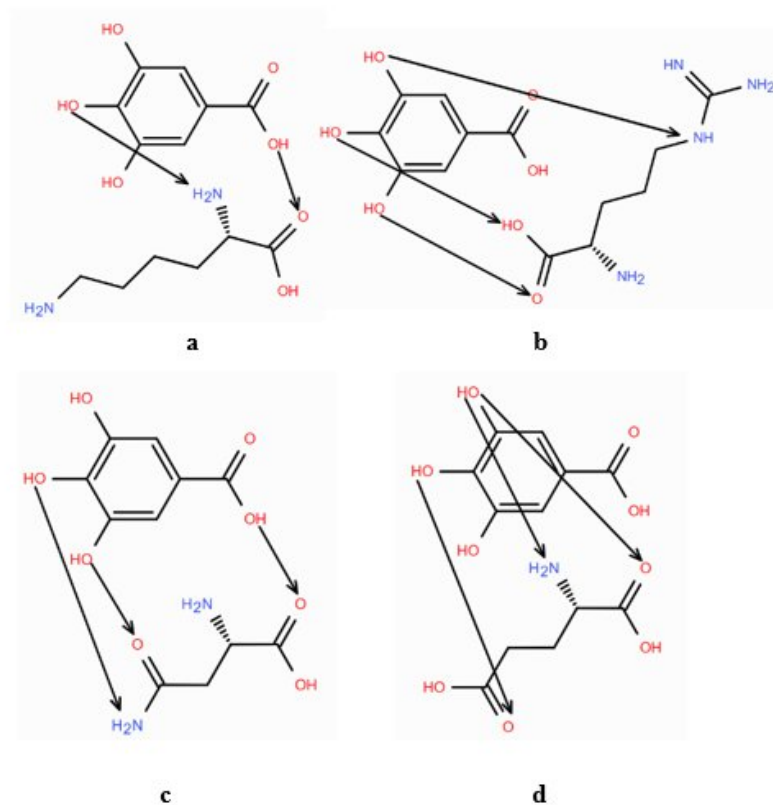


Рисунок 3.18 - Образование водородных связей между галловой кислотой и: a) - Lys; b) - Arg; c) - Asn; d) - Glu

Водородные связи между галловой кислотой и Arg (рисунок 3.18(b)) работают как дополнительные «стяжки», повышающие стабильность комплекса. Возможные комбинации:

1. Донор - фенольный -ОН галловой кислоты; акцептор - атомы азота в гуанидиновой группе Arg.
2. Донор - фенольный -ОН галловой кислоты; акцептор - карбонильный кислород (C=O) пептидной/карбоксильной группы Arg.
3. Донор – (-ОН) галловой кислоты; акцептор - O⁻ карбоксилата Arg.
4. Донор - NH фрагменты гуанидина (слабые доноры); акцептор - фенольные атомы кислорода галловой кислоты.

Основные пары «донор-акцептор» между Asn и галловой кислотой (рисунок 3.18(c)):

1. Донор - фенольный -ОН галловой кислоты; акцептор - карбонильный C=O карбоксамида Asn.

2. Донор - фенольный -ОН галловой кислоты; акцептор - азот амидной группы Asn (N в $-\text{CONH}^{2-}$).

3. Донор - фенольный -ОН; акцептор: C=O α карбоксильной группы Asn (если она не участвует в других взаимодействиях).

Возможные комбинации для галловой и Glu (рисунок 3.18(d)).

1. Донор - фенольный -ОН галловой кислоты; акцептор - карбонильный кислород C=O в группе COO^- боковой цепи Glu.

2. Донор - фенольный -ОН галловой кислоты; акцептор - карбонильный кислород C=O α -карбоксила Glu.

3. Донор - фенольный -ОН галловой кислоты; акцептор - азот в α - NH^{3+} группы Glu.

Из-за наличия сразу трёх фенольных -ОН у галловой кислоты возможна ситуация, когда одна молекула образует сразу несколько водородных связей с разными группами Glu, формируя устойчивую сеть взаимодействий.

3.3.4 Характеристика возникновения водородных связей между рутином и аминокислотами

Для рутина характерно образование водородных связей с такими аминокислотами как Arg, Asn, Lys и Ser. В образовании водородных связей участвуют карбоксильная и аминогруппы, а также боковой радикал отмеченных аминокислот (рисунок 3.19).

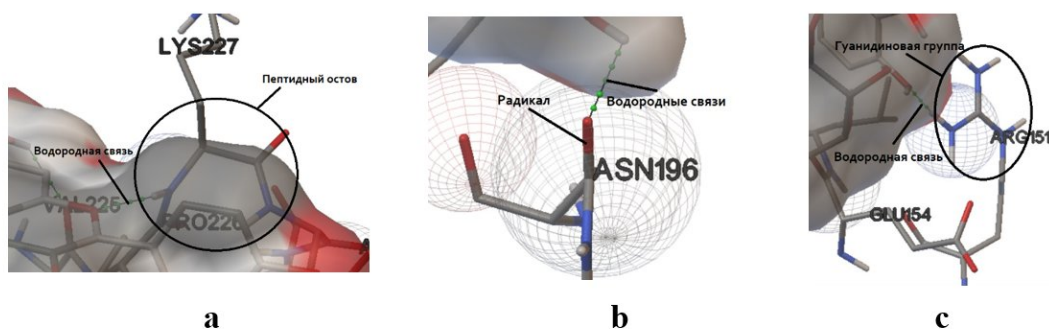


Рисунок 3.19 - Образование водородных связей между рутином и: а) - Lys в положении пептидного остова; б) - Asn в положении радикала; с) - Arg в положении гуанидиновой группы.

В паре рутин - Lys (рисунок 3.20(a)) роли распределяются так: донор водорода - это -ОН группы в молекуле рутина, акцептор - это атом в молекуле Lys, который предоставляет неподелённую пару электронов.

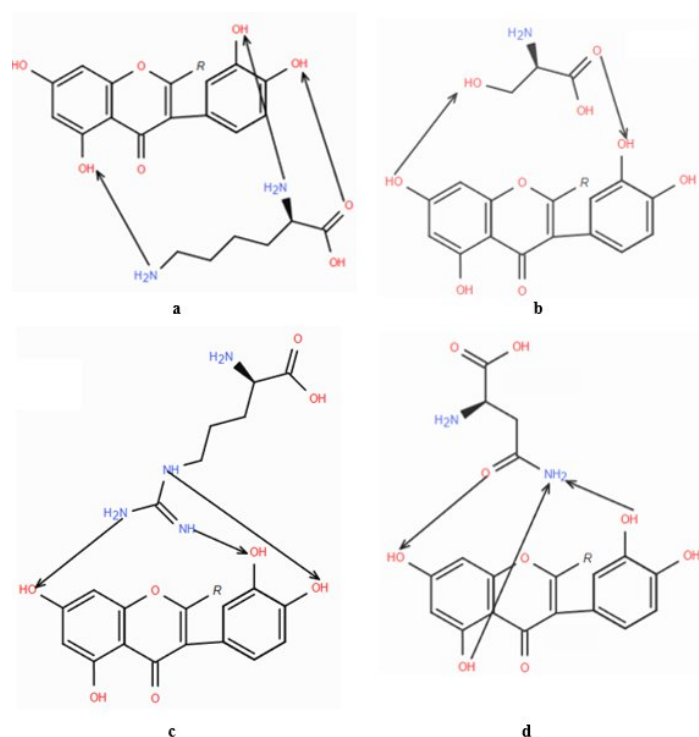


Рисунок 3.20 - Образование водородных связей между рутином и: а) - Lys; б) - Ser; с) - Arg; d) - Asn

Для комплекса рутин - Ser (рисунок 3.20(b)) характерны следующие распределения: донор водорода - это гидроксильные группы (-ОН) в молекуле рутина, акцептор - это атомы в молекуле Ser, у которых есть неподелённая пара электронов. В комплексе рутина с Arg (рисунок 3.20(c)): донор водорода - это гидроксильные группы (-ОН) в молекуле рутина.

Как и в случае с Ser, атом кислорода сильно поляризует связь О-Н: водород приобретает частичный положительный заряд и становится донором для водородной связи. Акцепторы - это атомы в гуанидиновой группе Arg.

В комбинации рутина с Asn (рисунок 3.20(d)) донор водорода - это гидроксильные группы (-ОН) в молекуле рутина. Акцепторы - это атомы в боковой цепи Asn. В его карбоксамидной группе есть два типа атомов, способных выступать акцепторами: 1) карбонильный кислород (C=O); 2) азот амидной группы (-NH-).

3.4 Оценка вероятности возникновения межмолекулярных взаимодействий цефтазида и фенольных фитометаболитов

Для верификации гипотезы о возможности образования молекулярных смешаннолигандных комплексов при совместном действии антибактериального агента цефтазида и ряда фенольных фитометаболитов (кверцетина, рутина и галловой кислоты) был проведён комплекс спектроскопических исследований методом инфракрасной Фурье-спектроскопии (ИК-Фурье). Экспериментальные спектры были зарегистрированы для индивидуальных чистых соединений: кверцетин, рутин, галловая кислота и для их комплексов с цефтазидом.

Сопоставление спектральных характеристик отдельных компонентов и их комбинаций позволило оценить вероятность возникновения межмолекулярных взаимодействий и структурных изменений, указывающих на формирование смешаннолигандных комплексов.

Спектры чистых биологически активных веществ, использованные в качестве референсных данных, представлены на рисунках 3.21-3.24.

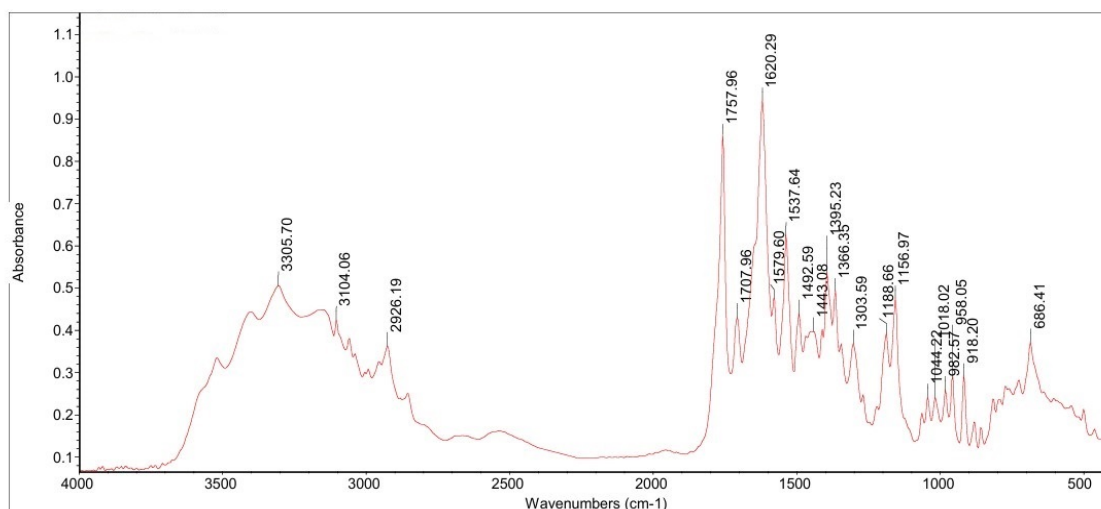


Рисунок 3.21 – ИК - спектр цефтазида

В области 3200-3500 cm^{-1} ИК-спектра локализованы полосы, соответствующие валентным колебаниям гидроксильных ($-\text{OH}$) групп. Различия в количестве и пространственном расположении данных групп в структуре исследуемых молекул обуславливают смещение полос поглощения фенольных фитометаболитов как в коротковолновую (синюю), так и в длинноволновую (красную) область относительно друг друга.

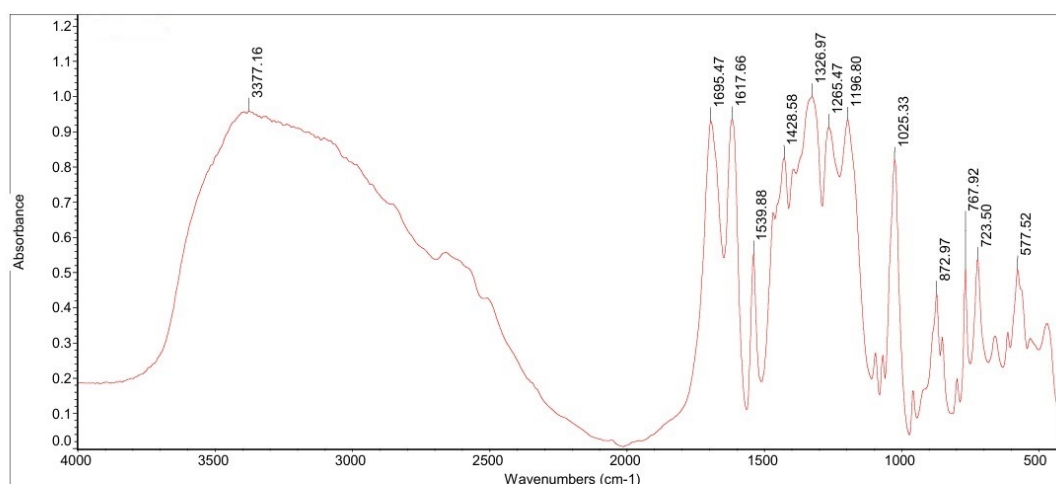


Рисунок 3.22 – ИК - спектр галловой кислоты

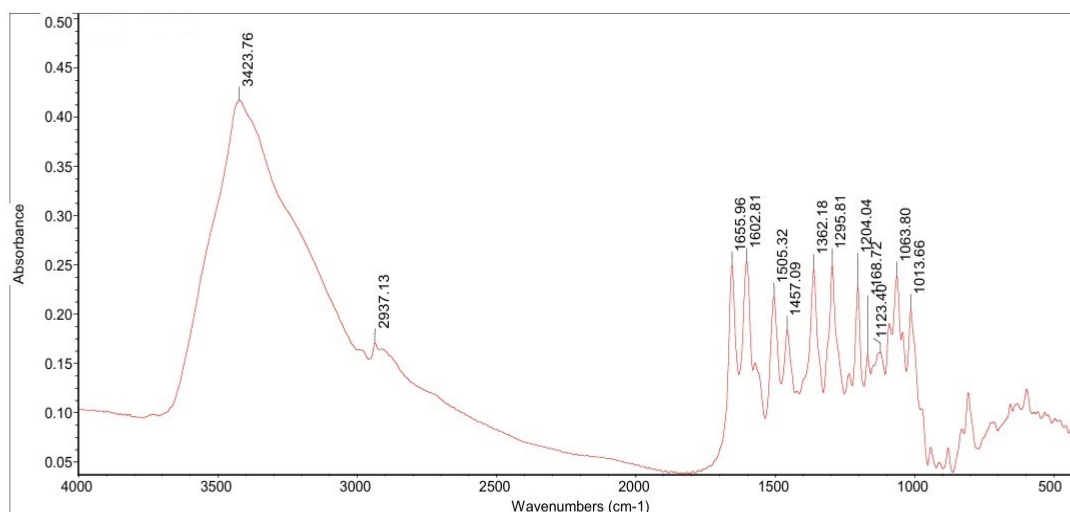


Рисунок 3.23 – ИК - спектр рутина

Полосы в диапазоне $2950\text{--}2850\text{ см}^{-1}$ соответствуют валентным колебаниям алифатических и ароматических углеводородных фрагментов, в том числе метильных групп ($-\text{CH}_3$), метиленовых групп ($-\text{CH}_2-$) и метиновых групп ($-\text{CH}-$) ароматических колец.

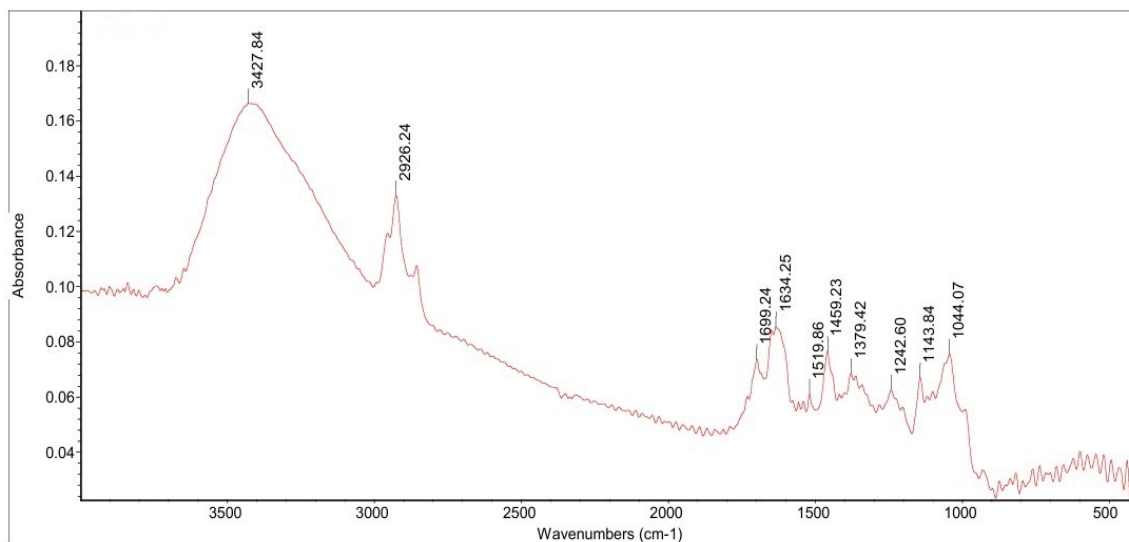


Рисунок 3.24 – ИК - спектр кверцетина

В ИК-спектрах исследуемых соединений полосы поглощения в диапазоне $\sim 1700\text{--}1550\text{ см}^{-1}$ соответствуют деформационным колебаниям связей $\text{C}-\text{C}$ в ароматических кольцах, а также валентным колебаниям $\nu(\text{C}=\text{O})$. Полосы в области $1600\text{--}1450\text{ см}^{-1}$ обусловлены маятниковыми и вилочковыми колебаниями метильных групп и углеводородных фрагментов $-\text{CH}-$, $-\text{CH}_2-$.

При частотах ниже 1400 см^{-1} наблюдаются сложные колебания углеродного скелета, включающие участие:

- деформационных колебаний $\delta(-\text{OH})$;
- крутильных колебаний $\delta(-\text{CH}_3)$;
- плоскостных деформационных колебаний с участием фрагментов $-(\text{CH})_n-$ и $-\text{OH}$ групп.

В ИК-спектре цефтазидима (рисунок 3.21) основные полосы поглощения локализованы на частотах, близких к эталонным значениям. При этом отмечаются незначительные смещения и появление дополнительных пиков.

В частности: интенсивный пик при 1525 см^{-1} соответствует валентному колебанию связи --P=O ; в диапазоне $3450\text{--}3250\text{ см}^{-1}$ наблюдаются дополнительные полосы, соответствующие валентным колебаниям аминогрупп; в области $1700\text{--}1350\text{ см}^{-1}$ фиксируются полосы, относящиеся к деформационным колебаниям $\delta(\text{--NH}_2)$, $\delta(\text{--NH--})$ и $\delta(\text{--O--N--C--})$.

Соответствие наблюдаемых полос поглощения в экспериментальных ИК-спектрах конкретным молекулярным колебаниям, а также совпадение экспериментальных и теоретических спектров верифицировали посредством квантово-химического моделирования в приближении PBE/3-21+G с применением масштабирующего фактора 0,923.

Установлено практически полное совпадение частот колебаний в сопоставляемых спектрах. Основной задачей спектрального анализа являлась проверка возможности химического взаимодействия цефтазидима с молекулами кверцетина, рутина и галловой кислоты.

Анализ ИК-спектров (рисунок 3.25) показал на примере взаимодействия цефтазидима и кверцетина отсутствие признаков химической реакции между указанными соединениями.

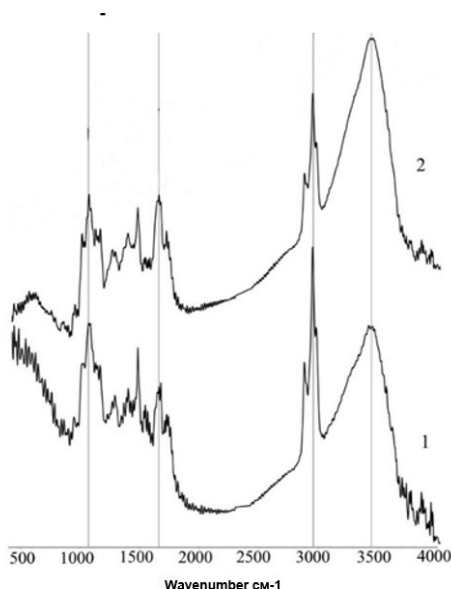


Рисунок 3.25 -1 – ИК - спектр кверцетина; 2 – ИК - спектр цефтазидима в комплексе с кверцетином

Характеристические полосы поглощения фенольных соединений сохраняются на тех же частотах как в индивидуальных спектрах, так и в смесях с цефтазидимом. При этом полосы поглощения цефтазидима в совместных системах не выявляются на фоне интенсивных полос фенольных компонентов, что обусловлено как низкой концентрацией антибиотика, так и отсутствием образования новых химических связей.

Отсутствие дополнительных пиков, соответствующих продуктам реакции, подтверждает отсутствие химического превращения. Таким образом, в растворе цефтазидим и исследуемые фенольные фитометаболиты (кверцетин, рутин, галловая кислота) способны образовывать исключительно межмолекулярные комплексы, не сопровождающиеся изменением химической структуры компонентов.

3.5 Оценка бактерицидной активности фенольных фитометаболитов и их комплексов с цефтазидимом

Оценка бактерицидной активности в отношении штаммов *S. aureus* ATCC 29213 и *P. aeruginosa* ATCC 27853 проводилась методом диффузии в агар.

Исследование включало несколько экспериментальных направлений: анализ действия индивидуальных фенольных фитометаболитов (рутина, кверцетина, галловой кислоты), а также изучение бактерицидного эффекта, обусловленного комплексным взаимодействием указанных метаболитов с антибиотиком - ингибитором синтеза бактериальной клеточной стенки.

Для оценки ингибирующего действия изолированных фенольных фитометаболитов (кверцетина, рутин, галловой кислоты) в рамках метода последовательных разведений (Государственная фармакопея РФ, ОФС 1.2.4.0001) в качестве исходной концентрации была выбрана дозировка 0,1 г/л. Далее осуществлялось двукратное последовательное разведение образца, в результате чего тестируемый диапазон концентраций охватывал следующие значения: 0,1 г/л; 0,05 г/л; 0,025 г/л; 0,0125 г/л; 0,0063 г/л; 0,003 г/л; 0,002 г/л.

В ходе экспериментального исследования, нацеленного на выявление аддитивного эффекта, оценивалась активность комбинаций фенольных фитометаболитов с цефтазидимом. При этом применялось разведение компонентов в соотношении 1:1 с учётом вышеуказанной линейки концентраций (рисунок 3.26, таблица 3.1).

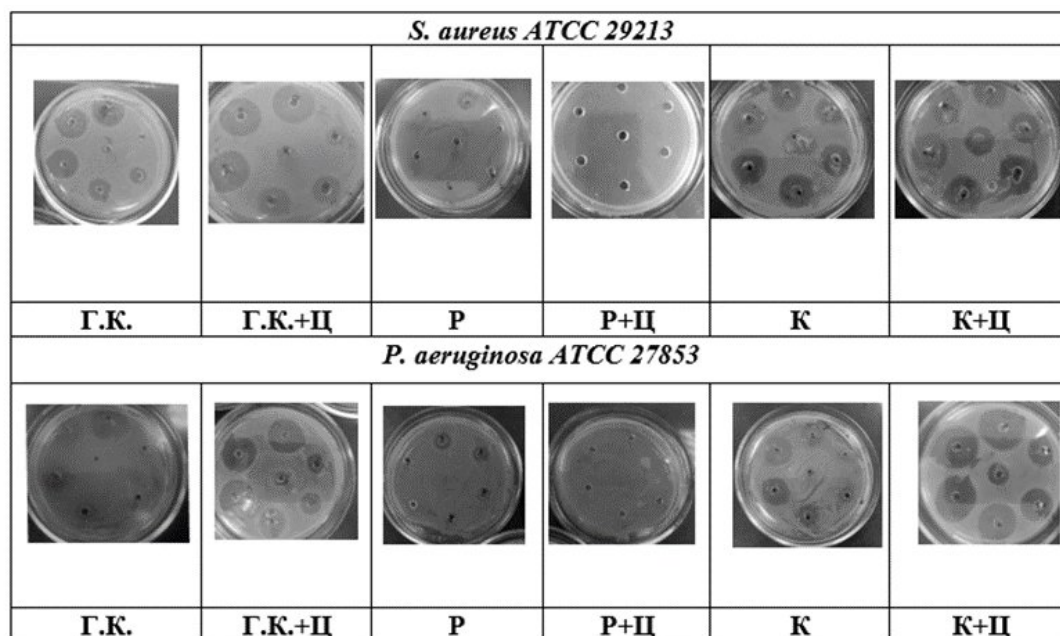


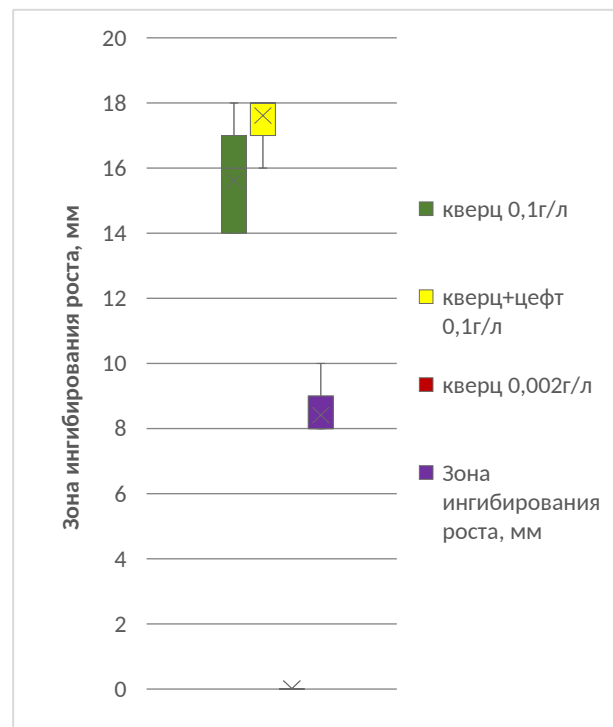
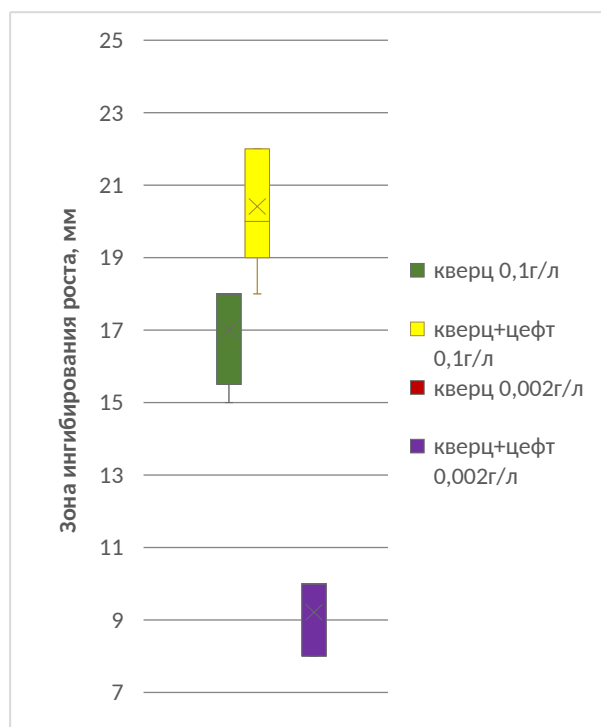
Рисунок 3.26 - Зоны ингибирования роста *S. aureus* ATCC 29213 и *P. aeruginosa* ATCC 27853 под действием фенольных фитометаболитов отдельно и в комбинации с цефтазидимом в отношении, мм

Таблица 3.1 – Величина зон ингибирования, мм

Наименование вещества	<i>S. aureus</i> ATCC 29213						
	Концентрация, г/л						
	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,0063	0,003	0,002
Кверцетин	16±0,89*	14,8±0,8*	14,4±0,98	13,2±1,36	12±0,89	10±0,89	0
Комплекс кверцетина и цефтазидима	20,40±0,7*	18,4±0,75*	16,8±0,49	14,8±0,49	13,2±0,49	11,2±0,49	9,2±0,49
Рутин	8,8±0,49** *	5±2,05	3,2±1,96	1,6±1,6	0	0	0
Комплекс рутина и цефтазидима	0	0	0	0	0	0	0
Галловая кислота	18,8±0,49	18±0,63	16,4±0,75	15,2±0,49	13,2±0,49	11,6±0,75	0
Комплекс галловой кислоты и	20,4±0,40	18±0,63	16,4±0,4	14,8±0,49	13,2±0,49	10,8±0,49	8,4±0,4

цефтазидима							
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853						
	Концентрация, г/л						
	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,0063	0,003	0,002
Кверцетин	15,6±0,75	14±0,63*	11,8±0,66*	9,6±0,75*	0	0	0
Комплекс кверцетина и цефтазидима	17,6±0,4	16±0*	14±0*	12,8±0,49*	11,2±0,49	9,2±0,49	8,4±0,4
Рутин	8,40±2,14	8±2,1	0	0	0	0	0
Комплекс рутина и цефтазидима	0	0	0	0	0	0	0
Галловая кислота	16,8±0,8	14,4±0,75	12,4±0,4**	9,6±0,75*	0	0	0
Комплекс галловой кислоты и цефтазидима	18,8±0,8	16,4±0,75	15,2±0,49**	13,2±0,49*	10,8±0,8	9,2±0,49**	0
Примечание: *p < 0,05; **p < 0,01 ; ***p < 0,001							

Для визуализации экспериментальных данных были построены диаграммы, отражающие средние значения зон ингибирования роста штаммов *S. aureus* ATCC 29213 и *P. aeruginosa* ATCC 27853 под действием фенольных фитометаболитов, а также их комплексов с цефтазидимом (рисунок 3.27).



а**б**

Рисунок 3.27 - Сравнение величин зон ингибирования роста микроорганизмов под действием кверцетина и комплекса кверцетин + цефтазидим, мм: а) - В отношении *S. aureus* ATCC 29213, б) - В отношении *P. aeruginosa* ATCC 27853

Анализ графических данных демонстрирует, что наиболее выраженный и статистически значимый эффект ингибирования роста изолированных штаммов *S. aureus* ATCC 29213 и *P. aeruginosa* ATCC 27853 в максимальных тестируемых концентрациях наблюдается при применении комбинации кверцетина (рисунок 3.27 а, б) с цефтазидимом. При этом зафиксировано увеличение зоны подавления роста на 17,3 % ($p \leq 0,05$) для *S. aureus* и на 28,2 % - для *P. Aeruginosa*.

В ходе исследования биологического действия рутина и его комбинации с цефтазидимом (рисунок 3.27 с, d) выявлена картина, обратная наблюдаемой для кверцетина: зафиксировано угнетение бактерицидной активности рутина в комплексе с цефтазидимом, что проявилось в отсутствии зон ингибирования роста штаммов *S. aureus* ATCC 29213.

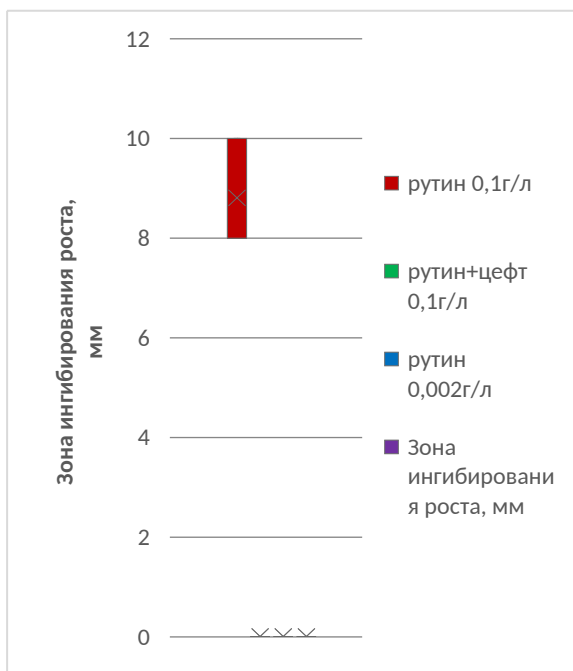
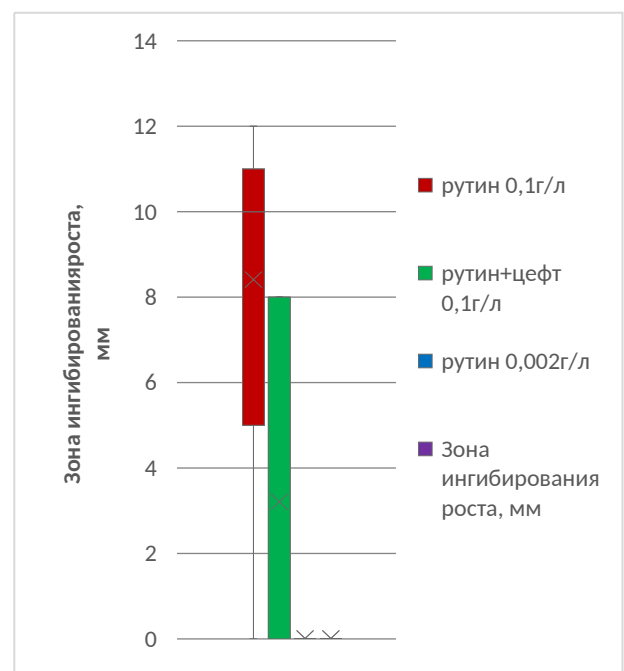
**с****d**

Рисунок 3.27 - Сравнение величин зон ингибирования роста микроорганизмов под действием рутина и комплекса рутин + цефтазидим, мм: с) - В отношении *S. aureus* ATCC 29213, d) - В отношении *P. aeruginosa* ATCC 27853

При оценке комплексного действия галловой кислоты с цефтазидимом в отношении штаммов *S. aureus* ATCC 29213 отмечено увеличение зоны ингибирования на 8 % при концентрации 0,1 г/л; при снижении концентрации соединения выраженного ингибирующего эффекта не зарегистрировано.

В ходе оценки антимикробной активности галловой кислоты в отношении штаммов *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (рисунок 3.27 е, f) выявлено достоверное усиление ингибирующего эффекта при её совместном применении с цефтазидимом во всём диапазоне тестируемых концентраций (от 0,1 г/л до 0,002 г/л). При этом прирост показателя зоны ингибирования относительно контрольных значений составил 11 %, 13 %, 22 % ($p \leq 0,01$), 37 % ($p \leq 0,05$), 52 % и 84 % ($p \leq 0,01$) соответственно. Установлена закономерность: по мере снижения концентрации галловой кислоты наблюдается динамическое увеличение зон подавления роста бактериальных штаммов относительно контрольных показателей.

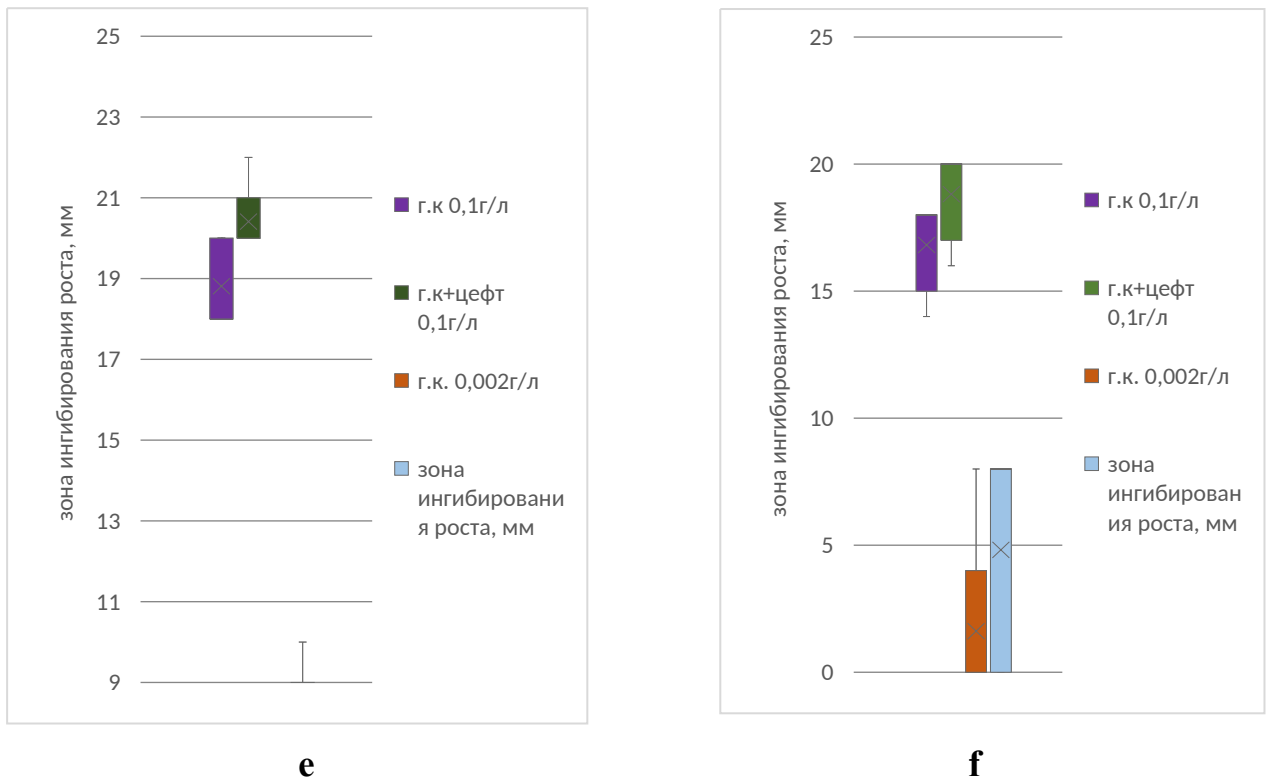


Рисунок 3.27 - Сравнение величин зон ингибирования роста микроорганизмов под действием галловой кислоты и комплекса галловая кислота + цефтазидим, мм: е) - В отношении *S. aureus* ATCC 29213, ф) - В отношении *P. aeruginosa* ATCC 27853

3.6 Статистическая обработка данных квантового анализа

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием комплекса методов параметрической и многомерной статистики. На первом этапе для всех исследуемых показателей рассчитывались описательные статистики: средние арифметические значения, стандартные отклонения и стандартные ошибки среднего. Для визуальной оценки распределения данных и выявления возможных выбросов строились диаграммы размаха (ящики с усами).

С целью выявления статистически значимых различий между веществами по всему комплексу показателей был применён многомерный дисперсионный анализ (MANOVA). Для оценки вклада каждого отдельного показателя в общую дифференциацию веществ использовались одномерные дисперсионные комплексы (ANOVA). В случае обнаружения значимых различий проводились апостериорные

сравнения с использованием критерия Тьюки (HSD), позволяющие определить, между какими именно парами веществ эти различия наблюдаются.

Для количественной оценки влияния типа вещества на исследуемые показатели была построена серия множественных линейных регрессионных моделей с использованием фиктивных переменных. С целью снижения размерности данных и визуализации многомерных взаимосвязей применён метод главных компонент (PCA). Корреляционный анализ использовался для выявления структуры взаимосвязей между отдельными показателями.

На завершающем этапе исследования был проведён QSAR-анализ, направленный на установление связи между молекулярными дескрипторами веществ и их биологической активностью. Значения дескрипторов получены из открытой базы данных PubChem.

Расчёт описательных статистик, построение графиков, проведение MANOVA и апостериорных тестов выполнялись в пакете Statistica 10. Множественная регрессия, метод главных компонент, корреляционный и QSAR-анализ реализованы в среде R версии 4.5. Предварительная обработка данных, а также оценка кластеров t-критерием Стьюдента осуществлялась с помощью Microsoft Excel.

3.6.1 Показатели эффективности веществ

В результате молекулярного докинга для каждого из четырех веществ - цефтазидима, галловой кислоты, кверцетина и рутина - было получено по 50 значений по каждому из шести исследуемых показателей. На основе этих данных рассчитаны средние арифметические значения (M) и стандартные ошибки среднего (m), которые представлены в таблице 3.2. Показатели включают: количество образованных водородных связей (h -bond), число кластеров, отражающее вариабельность ориентации лиганда в активном центре, свободную энергию образования комплекса (ΔG), константу ингибирования (K_i), эффективность лиганда (LE) и суммарную энергию межмолекулярного взаимодействия (ΔE). Анализ приведенных значений

позволяет предварительно оценить сродство веществ к белку и выявить соединения, перспективные для дальнейшего изучения.

Таблица 3.2 - Показатели эффективности исследуемых веществ ($M \pm m$, $n = 50$)

Показатель	Цефтазидим	Галловая кислота	Кверцетин	Рутин
h-bond	$2,16 \pm 0,14$	$3,08 \pm 0,11$	$2,20 \pm 0,18$	$1,22 \pm 0,15$
Кластеры	$2,88 \pm 0,15$	$8,00 \pm 0,06$	$12,10 \pm 0,18$	$17,73 \pm 0,19$
ΔG , ккал/моль	$-3,85 \pm 0,13$	$-3,43 \pm 0,02$	$-4,31 \pm 0,09$	$0,55 \pm 0,13$
K_i , μM	3899 ± 1112	3136 ± 112	1200 ± 207	420155 ± 34544
LE	$-0,102 \pm 0,004$	$-0,288 \pm 0,003$	$-0,189 \pm 0,008$	$-0,020 \pm 0,002$
ΔE	$-3,22 \pm 0,16$	$-2,67 \pm 0,08$	$-0,206 \pm 0,015$	$-0,18 \pm 0,02$

Проведенный описательный анализ позволил выявить различия в профилях эффективности исследуемых веществ.

Наиболее сильное сродство к белку, оцениваемое по свободной энергии образования комплекса ΔG , демонстрирует кверцетин ($-4,31 \pm 0,09$ ккал/моль). Немного ниже значения у цефтазидима ($-3,85 \pm 0,13$ ккал/моль) и галловой кислоты ($-3,43 \pm 0,02$ ккал/моль). Рутин демонстрирует положительные значения ΔG ($0,55 \pm 0,13$ ккал/моль), что свидетельствует о термодинамической невыгодности связывания.

Значения K_i обратно пропорциональны эффективности ингибирования роста. Наименьшие значения K_i соответствуют наибольшей вероятности связывания, что характерно для кверцетина ($1200 \pm 207 \mu M$). У рутина же данный показатель во много раз выше ($420155 \pm 34544 \mu M$), что указывает на низкую ингибирующую способность.

По количеству образуемых h-bond выделяется галловая кислота ($3,08 \pm 0,11$), при этом у рутина, данный показатель демонстрирует минимальные значения ($1,22 \pm 0,15$).

По значениям показателя LE можно судить о вкладе каждого тяжёлого атома в связывание. Данное значение оказалось отрицательным для всех исследуемых

соединений. Наименьшее отрицательное значение продемонстрировал рутин ($-0,020 \pm 0,002$), но с учётом других показателей, это не рассматривается как преимущество.

Таким образом, предварительно можно предположить, что по рассматриваемым параметрам исследуемых веществ наибольшей аффинностью к белкам мишеням обладает кверцетин, чуть меньшее сродство демонстрирует галловая кислота, а рутин характеризуется наименее выраженной активностью.

3.6.2 Визуальная оценка данных

Для визуальной оценки распределения полученных данных и определения характера различий между исследуемыми веществами были построены диаграммы размаха для каждого рассматриваемого показателя. Данный способ позволяет наглядно продемонстрировать медиану, межквартильный размах, общий разброс значений и выявить наличие выбросов и крайних точек. Это даёт возможность понимания структуры данных для обоснования выбора последующих статистических критериев.

На рисунке 3.28 представлена диаграмма размаха для показателя h-bond. Она отражает количество водородных связей, которые образуются между исследуемым веществом и аминокислотными остатками белка.

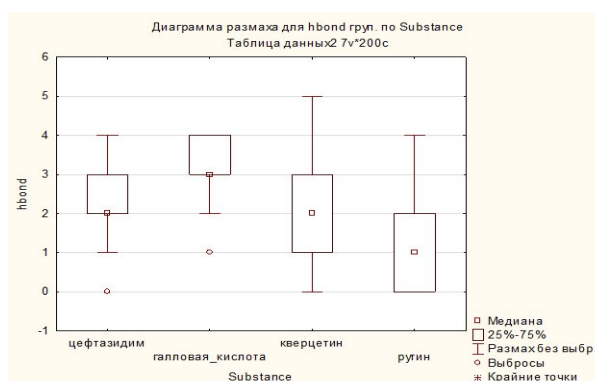


Рисунок 3.28 - Диаграмма размаха для показателя h-bond у исследуемых веществ

Анализ построенной диаграммы демонстрирует наибольшее количество водородных связей у галловой кислоты, у которой значение медианы составляет око-

ло 3, а межквартильный размах варьируется от 2 до 4, что говорит об умеренной вариабельности данных.

У кверцетина медиана фиксируется на уровне 2, с более широким разбросом, в том числе отдельные выбросы достигают 5 – 6 связей.

Для цефтазидима характерно компактное распределение с медианой около 2 и незначительным числом выбросов.

Наименьшие значения показателя h-bond зафиксированы для рутина. Его медиана имеет значения близкие к 1, а большинство связей варьируются от 1 до 2. В некоторых случаях крайние точки рутина имеют значение 0. Учитывая это, можно предположить, об отсутствии водородных связей в отдельных случаях.

Таким образом, по способности образования водородных связей можно провести следующее ранжирование исследуемых веществ: галловая кислота > кверцетин $\approx$ цефтазидим > рутин.

Для оценки вариабельности ориентации исследуемых веществ в активном центре белка был проанализирован показатель «Кластеры» (рисунок 3.29).

Данный показатель отражает количество близких по энергии положений молекулы в активном центре белка, объединенных в кластеры. Меньшее число кластеров говорит о стабильном связывании, большее указывает на неспецифическое связывание, либо на высокую подвижность молекулы.

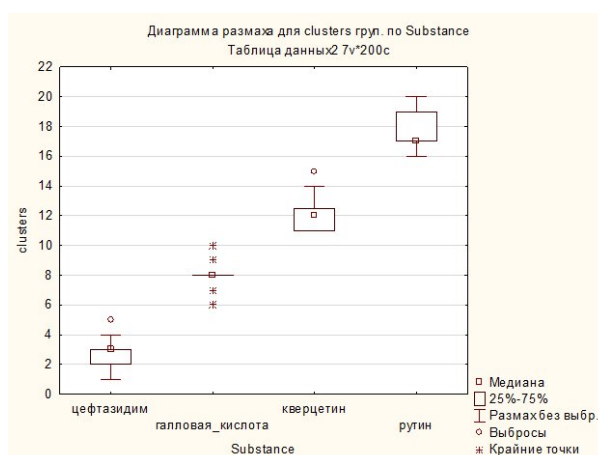


Рисунок 3.29 - Диаграмма размаха для показателя «Кластеры» у исследуемых веществ

Необходимо уточнить, что изначально для удобства расчётов для каждого исследуемого белка было выделено по пять классов. Для корректной работы ста-

тистических алгоритмов номера кластеров были сдвинуты: цефтазидиму соответствовали значения от 1 до 5, галловой кислоте от 6 до 10, кверцетину от 11 до 15, и галловой кислоте от 16 до 20.

Значения, представленные на диаграмме (рисунок 3.29) позволяют дать оценку равномерности или неравномерности распределения докинга между различными кластерами.

Для цефтазидима отмечается компактное распределение. Медиана имеет значения от 2 до 3, а межквартильный интервал охватывает значения от 2 до 4, что свидетельствует о том, что большинство конформации концентрируется в двух-трех кластерах. Это является подтверждением стабильной и воспроизводимой ориентации молекулы, выгодной для комплексообразования.

Галловая кислота демонстрирует сдвиг распределения в сторону более высоких номеров кластеров: медиана составляет около 8, межквартильный интервал - от 7 до 9. С учетом введенного сдвига это означает, что результаты измерений для данного вещества тяготеют к кластерам 2-4 (в исходной нумерации), что также говорит о достаточно стабильном связывании.

Для кверцетина распределение смещается еще дальше: медиана находится на уровне 12-13, межквартильный интервал охватывает значения 11-14. В исходной нумерации это соответствует кластерам 2-4, однако более широкий разброс может указывать на несколько большую вариабельность ориентации по сравнению с предыдущими веществами.

Наиболее выраженные особенности наблюдаются для рутина: медиана приближается к 18, межквартильный интервал составляет 17-19, при этом фиксируется значительное число выбросов, достигающих 20-21. В пересчете на исходную нумерацию (16-20 соответствует кластерам 1-5 рутина) это означает, что измерения распределяются практически по всем пяти кластерам, причем достаточно равномерно. Отсутствие явного доминирования одного-двух кластеров может свидетельствовать о неспецифическом характере связывания либо о высокой конформационной подвижности молекулы рутина в активном центре.

Таким образом, наиболее стабильную и воспроизводимую ориентацию демонстрирует цефтазидим, тогда как для рутина характерна максимальная вариативность положений, что может указывать на менее специфическое взаимодействие с белком-мишенью.

О термодинамической стабильности комплексов, образованных между исследуемыми веществами и белками-мишенями, можно судить по диаграмме размаха, построенной для показателя свободная энергия образования комплекса ΔG (рисунок 3.30). Чем более отрицательное значение принимает данный показатель, тем сильнее и стабильнее взаимодействие.

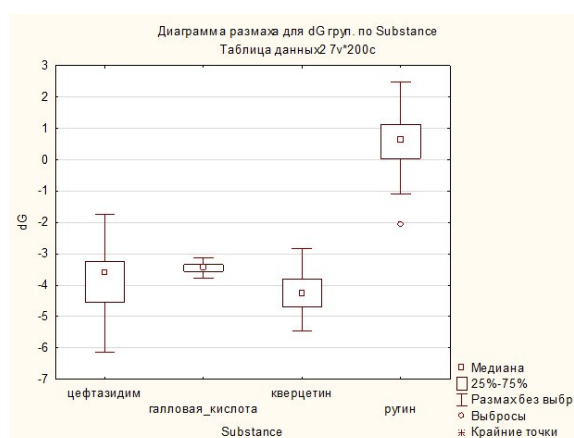


Рисунок 3.30 - Диаграмма размаха для показателя ΔG (свободная энергия образования комплекса) у исследуемых веществ

Анализируя распределение значений свободной энергии образования комплекса можно выявить существенные различия между исследуемыми веществами.

У кверцетина фиксируются наиболее отрицательные значения ΔG , что указывает на более стабильное и прочное связывание. Медиана данного показателя находится в пределах значения -4,3 ккал/моль, при диапазоне значений межквартильного интервала от -4,5 до -4,0 ккал/моль. О стабильном и воспроизводимом характере взаимодействия с белком-мишенью свидетельствует также компактное распределение значений и отсутствие выбросов.

Значения ΔG у цефтазида и галловой кислоты близкие к кверцетину, но менее отрицательные. Медиана показателя ΔG у цефтазида составляет около -3,8 ккал/моль, межквартильный интервал располагается в диапазоне от -4,2 до -3,4 ккал/моль. У галловой кислоты медиана находится на уровне -3,4 ккал/моль, а межквартильные интервал заметно уже (от -3,5 до -3,3 ккал/моль). Это может говорить о высокой воспроизводимости результатов для данного вещества. Комплексы цефтазида и галловой кислоты отличаются умеренной стабильностью, но уступают по прочности связывания кверцетину.

Рутин, с положительными значениями свободной энергии образования комплекса выделяется на общем фоне. Медиана значения ΔG для него составляет около +0,5 ккал/моль, а межквартильный интервал охватывает значения от 0 до +1,0 ккал/моль. Данные показатели свидетельствуют о термодинамической невыгодности образования комплекса с белком-мишенью и отсутствии стабильного связывания. На возможный неспецифический характер связывания указывает значительный разброс данных и наличие выбросов в отрицательной области (до -1,5 ккал/моль).

Полученные результаты согласуются с данными анализа кластеров, где рутин характеризуется наибольшей вариабельностью ориентаций, что указывает на неспецифический характер взаимодействий.

Исходя из вышеизложенного по значениям свободной энергии образования комплекса исследуемые вещества можно ранжировать в следующей последовательности: кверцетин (наиболее сильное связывание) > цефтазид $\approx$ галловая кислота (умеренное связывание) > рутин (связывание практически отсутствует).

Одним из важнейших показателей эффективности ингибирования является константа ингибирования K_i . Условно, она отражает концентрацию вещества, необходимую для подавления 50% активности белка. Меньшие значения K_i указывают на более эффективный ингибирующий потенциал вещества. На рисунке 3.31 представлена диаграмма размаха для данного показателя.

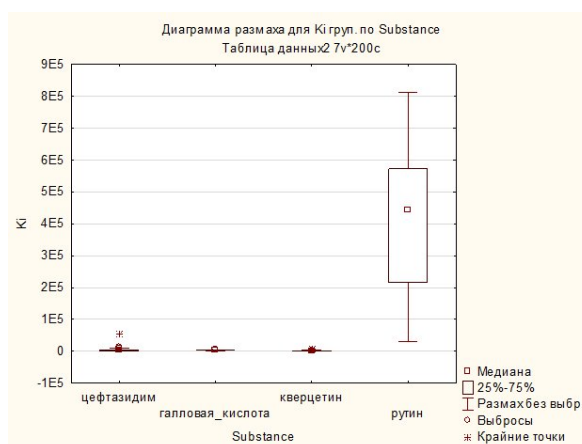


Рисунок 3.31 - Диаграмма размаха для показателя K_i (константа ингибирования) у исследуемых веществ

Проведенный анализ распределения значений K_i выявил кардинальные различия у исследуемых веществ. Так наименьшие значения K_i наблюдаются у кверцетина. Медиана данного показателя находится около значения 1200 μM , а межквартильный интервал в диапазоне от 600 до 1800 μM . Компактность распределения значений и отсутствие выраженных выбросов указывает на стабильный и воспроизводимый ингибирующий эффект данного вещества.

Для галловой кислоты и цефтазида характерны более высокие значения K_i , что указывает на их меньшую ингибирующую активность. Медиана галловой кислоты составляет около 3100 μM при относительно узком межквартильном интервале (примерно 2800-3400 μM). Это свидетельствует о высокой воспроизводимости результатов. Медиана цефтазида находится на уровне 3900 μM , но межквартильный интервал характеризуется значительным разбросом данных (от 1500 до 7000 μM , а верхняя граница размаха достигает 15000 μM). Это может указывать на чувствительность связывания цефтазида к условиям моделирования либо на наличие нескольких сопоставимых по энергии, но различных по эффективности поз молекулы.

Значения константы ингибирования K_i рутина заметно превышают показатели других исследуемых веществ. Так медиана K_i у данного соединения составляет приблизительно 420 000 μM , межквартильный интервал охватывает диапазон от 200 000 до 600 000 μM , причем отдельные точки достигают значений 800 000-900

000 μM . Такие высокие значения K_i указывают о крайне низкой эффективности рутина. Фактически, для подавления активности белка-мишени, требуются концентрации рутина, измеряемые сотнями миллимолей, а это исключает возможность специфического ингибирующего действия в физиологических условиях.

Принимая во внимание вышеизложенное относительно показателя K_i можно сформировать следующий ряд по эффективности ингибирования среди исследуемых веществ: кверцетин (наиболее эффективный) > галловая кислота > цефтазидим > рутин (крайне низкая эффективность). Примечательно, что полученные результаты полностью согласуются с ранее зафиксированными данными по свободной энергии образования комплекса ΔG . Это подтверждает, что наиболее сильное и стабильное связывание с белком демонстрирует именно кверцетин, тогда как для рутина взаимодействие практически отсутствует.

На последнем этапе давалась оценка вклада каждого тяжелого атома в связывание, в связи с чем был проанализирован показатель эффективности лиганда LE. Он представляет собой отношение свободной энергии связывания к числу тяжёлых атомов молекулы и позволяет не только сравнивать вещества различного размера, но и давать оценку оптимальности структуры молекулы, с точки зрения эффективности использования ее функциональных групп. На рисунке 3.32 представлена диаграмма размаха для показателя LE.

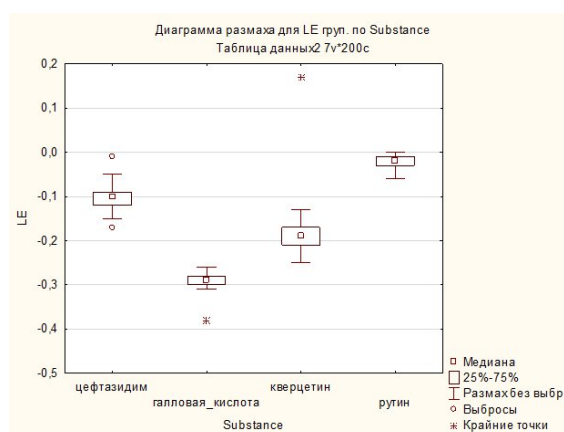


Рисунок 3.32 - Диаграмма размаха для показателя LE (эффективность лиганда у исследуемых веществ)

Наименее отрицательные (высокие) значения LE у рутина. Медиана данного показателя у него находится вблизи значения $-0,02$, а межквартильный интервал в диапазоне от $-0,03$ до $-0,01$. Это сопровождается компактным распределением с незначительным числом выбросов. Однако, несмотря на описанные выше, умеренные значения показателей, положительные значения свободной энергии образования комплекса ΔG у рутина ставят под сомнение факт образования стабильного комплекса.

В связи с этим высокие (близкие к нулю) значения LE для рутина не могут рассматриваться как свидетельство эффективности лиганда, а скорее отражают отсутствие связывания.

Цефтазидим характеризуется медианным значением LE около $-0,10$ с межквартильным интервалом от $-0,12$ до $-0,08$. Распределение достаточно компактно, что указывает на стабильную эффективность использования атомов данной молекулы при связывании.

Кверцетин демонстрирует несколько более низкие значения LE: медиана составляет примерно $-0,19$, межквартильный интервал охватывает диапазон от $-0,22$ до $-0,16$. Учитывая, что для кверцетина были показаны наиболее отрицательные значения ΔG , описанные значения LE могут свидетельствовать о том, что прочное связывание достигается за счет большего вклада каждого атома, но при этом молекула, возможно, содержит некоторые структурные элементы, не оптимальные для связывания.

Наиболее низкие значения LE (наиболее отрицательные) наблюдаются для галловой кислоты: медиана находится вблизи $-0,29$, межквартильный интервал составляет от $-0,30$ до $-0,28$, при этом распределение отличается исключительной компактностью. Столь низкие значения LE при умеренной свободной энергии связывания ($-3,43$ ккал/моль) указывают на то, что молекула галловой кислоты, будучи небольшой по размеру, не обеспечивает достаточного вклада каждого атома в связывание, что может быть связано с ее структурными особенностями.

Таким образом, интерпретация показателя LE в данном случае требует совместного учета с данными по свободной энергии связывания. Наиболее сбалансиро-

рованным сочетанием умеренно отрицательной ΔG и приемлемых значений LE характеризуется кверцетин, тогда как высокие значения LE для рутина обусловлены отсутствием связывания, а низкие значения для галловой кислоты указывают на не оптимальность ее структуры для взаимодействия с белком.

Для оценки суммарного вклада нековалентных взаимодействий (ван-дер-ваальсовых и электростатических) в стабилизацию комплекса был проанализирован показатель ΔE . Отрицательные значения данной величины соответствуют выгодным взаимодействиям: чем значение отрицательнее, тем лучше молекула «упакована» в активном центре белка. На рисунке 3.33 представлена диаграмма размаха для ΔE .

Анализ распределения значений энергии взаимодействия выявляет выраженные различия между исследуемыми веществами.

Наиболее отрицательные значения ΔE , соответствующие наиболее выгодным межмолекулярным взаимодействиям, наблюдаются для цефтазидима и галловой кислоты. У цефтазидима медиана варьируется в пределах -3,2, а межквартильный интервал охватывает диапазон от -3,8 до -2,6. Отмечается значительный разброс данных и наличие выбросов в стороны и более отрицательных (-5,5) и менее отрицательных значений. У галловой кислоты медиана находится на уровне -2,7, с межквартильным интервалом от -3,0 до -2,4. Выраженных выбросов не наблюдается, что может указывать на стабильный и воспроизводимый характер взаимодействий.

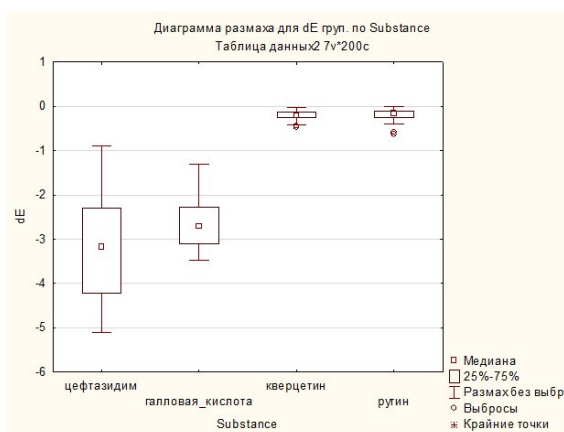


Рисунок 3.33 - Диаграмма размаха для показателя ΔE (энергия межмолекулярного взаимодействия) у исследуемых веществ

Для кверцетина характерны значительно менее отрицательные значения ΔE . Медиана находится на уровне -0,2, а межквартильный интервал находится в диапазоне от -0,3 до -0,1. Отмечается достаточно компактное распределение с минимальным разбросом данных. Такие близкие к нулю значения энергии взаимодействия в сочетании с отрицательной свободной энергии образования комплекса ΔG (-4,31 ккал/моль) могут свидетельствовать о том, что стабилизация комплекса кверцетина с белком-мишенью в большинстве своём достигается не столько за счёт суммарных межмолекулярных взаимодействий, сколько под действием образования специфических водородных взаимодействий или гидрофобных эффектов.

Значения ΔE рутина находятся вблизи нулевой отметки. Так медиана составляет около -0,18, а межквартильный интервал варьируется в диапазоне от -0,25 до -0,10. Такие показатели в сочетании с положительными значениями ΔG и экстремально высокими значениями K_i говорят об отсутствии стабильного связывания с белком-мишенью.

Анализируя данные по энергии межмолекулярного взаимодействия, можно разделить исследуемые вещества на две группы. Первая группа – цефтазидим и галловая кислота, для которых характерны выгодные взаимодействия. Вторая группа – кверцетин с рутином, с близкими к нулю значениями ΔE . Необходимо, однако, принять во внимание, что несмотря на низкие значения ΔE кверцетин обладает

благоприятными для связывания значениями ΔG , что свидетельствует о возможных специфичных механизмах его связывания с белками.

Проведенное исследование по шести показателям позволило выявить существенные различия в характере взаимодействий между исследуемыми веществами и белками-мишенями и дать обобщённую оценку их ингибирующему потенциалу. Опираясь на значения рассмотренных показателей, можно провести следующее ранжирование веществ по эффективности связывания:

1) Кверцетин продемонстрировал наиболее высокую эффективность по критериям связывания среди всех исследуемых веществ. У него отмечено самое отрицательное значение свободной энергией образования комплекса ($\Delta G = -4,31 \pm 0,09$ ккал/моль) и наименьшее значение константы ингибирования ($K_i = 1200 \pm 207$ μM). Это указывает на возможность наиболее прочного и термодинамически выгодного взаимодействия с белком-мишенью. При этом он образует умеренное количество водородных связей и имеет слабый разброс конформации по пяти кластерам, что также свидетельствует о стабильной, но единственной ориентации в активном центре. Низкие значения энергии межмолекулярного взаимодействия кверцетина ($\Delta E = -0,206 \pm 0,015$) свидетельствуют о том, что стабилизация комплекса кверцетина и белка-мишени осуществляется также преимущественно посредством специфических, а не суммарных нековалентных взаимодействий.

2) Цефтазидим и галловая кислота занимают промежуточное положение по эффективности связывания с белками-мишенями. Их профили схожи, но не идентичны. Цефтазидим характеризуется умеренными значениями свободной энергией образования комплексов ($\Delta G = -3,85 \pm 0,13$ ккал/моль) и константы ингибирования ($K_i = 3899 \pm 1112$ μM), а галловая кислота имеет более высокие показатели ΔG ($-3,43 \pm 0,02$ ккал/моль) и K_i (3136 ± 112 μM), максимальное количество водородных связей ($3,08 \pm 0,11$) и более стабильную кластерную структуру. Для комплексов обоих веществ характерны выраженные отрицательные значения ΔE (от $-2,7$ до $-3,2$), что указывает на значительный вклад межмолекулярных взаимодействий в стабилизацию связей.

3) Рутин занимает особое положение, характеризуясь крайне низкой эффективностью взаимодействия. Положительные значения свободной энергии образования комплекса ($\Delta G = 0,55 \pm 0,13$ ккал/моль) и экстремально высокие значения константы ингибирования ($K_i = 420155 \pm 34544$ μM) в сравнении с другими веществами говорят о термодинамической невыгодности комплексообразования с белком и фактически исключают возможность специфического ингибирующего действия в физиологических условиях. Высокая кластерная вариабельность ($17,73 \pm 0,19$) может свидетельствовать о неспецифичном характере связывания и высокую подвижность молекулы в активном центре. Еще одним подтверждением отсутствия стабильного взаимодействия являются низкие значения LE и ΔE в сочетании с положительной ΔG .

3.6.3 Определение значимых различий между исследуемыми веществами

Оценка влияния типа вещества на комплекс исследуемых показателей осуществлялась посредством многомерного дисперсионного анализа (MANOVA). Зависимыми переменными выступали следующие показатели: количество водородных связей (h-bond), свободная энергия образования комплекса (ΔG), константа ингибирования (K_i), эффективность лиганда (LE) и энергия межмолекулярного взаимодействия (ΔE). Фактором служило вещество (цефтазидим, галловая кислота, кверцетин, рутин).

Показатель «Кластеры» был исключен из многомерного анализа по следующим причинам. В процессе исследования для каждого вещества выделялось по пять кластеров, однако для корректной работы статистических алгоритмов номера кластеров были искусственно сдвинуты: цефтазидиму соответствовали значения 0-5, галловой кислоте - 6-10, кверцетину - 11-15, рутину - 16-20. Таким образом, принадлежность к кластеру оказалась жестко детерминирована типом вещества, что делает анализ данного показателя тривиальным и не несущим содержательной информации о качестве связывания. По этой причине в дальнейшем многомерном анализе показатель «Кластеры» не учитывался.

Полученные результаты (таблица 3.3) свидетельствуют о наличии высоко значимых различий между исследуемыми веществами по всему комплексу показателей (критерий Уилкса = 0,00087; $F = 244,28$; $p < 0,001$). Значение критерия, близкое к нулю, указывает на выраженную дифференциацию веществ в многомерном пространстве признаков.

Таблица 3.3 - Многомерные критерии значимости

Эффект	Критерий	Значение	F	SS эффекта	SS ошибки	p
Свободный член	Уилкса	0,00890	2599,68	5	141,0	<0,001
Вещество	Уилкса	0,00087	244,28	15	389,8	<0,001

Для выявления показателей, вносящих наибольший вклад в обнаруженные различия, были проанализированы одномерные результаты для каждой зависимой переменной (таблица 3.4).

Таблица 3.4 - Одномерные результаты ANOVA для исследуемых показателей

Показатель	Эффект	SS	MS	F	p
h-bond	Вещество	27,68	9,23	8,60	<0,001
	Ошибка	155,56	1,07		
ΔG	Вещество	103,66	34,55	84,00	<0,001
	Ошибка	59,65	0,41		
Ki	Вещество	$1,34 \times 10^{12}$	$4,47 \times 10^{11}$	109,64	<0,001
	Ошибка	$5,92 \times 10^{11}$	$4,08 \times 10^9$		
LE	Вещество	1,134	0,378	246,98	<0,001
	Ошибка	0,222	0,0015		
ΔE	Вещество	250,05	83,35	159,55	<0,001
	Ошибка	75,75	0,522		

Анализ силы эффекта (по значению F-критерия) показывает, что наиболее выраженные различия между веществами наблюдаются по показателям:

1. LE ($F = 246,98$);
2. ΔE ($F = 159,55$);
3. Ki ($F = 109,64$);
4. ΔG ($F = 84,00$);
5. h-bond ($F = 8,60$).

Исходя из полученных значений, можно заключить, что все показатели вносят статистически значимый вклад в дифференциацию исследуемых веществ.

Чтобы детально оценить различия между отдельными веществами был проведен апостериорный тест Тьюки (HSD) для каждого показателя. В таблице 3.5 представлены результаты попарных сравнений для показателя h-bond.

Таблица 3.5 - Попарные сравнения для показателя H-bond (критерий Тьюки)

Вещество	Среднее	Цефтазидим (2,16)	Галловая кислота (3,08)	Кверцетин (2,40)	Рутин (1,78)
Цефтазидим	2,16		<0,001	0,694	0,738
Галловая кислота	3,08	<0,001		0,011	0,003
Кверцетин	2,40	0,694	0,011		0,363
Рутин	1,78	0,738	0,003	0,363	

Примечание: жирным выделены значимые различия

Галловая кислота заметно выделяется на фоне остальных исследуемых веществ ($p < 0,05$), так как имеет наибольшее среднее значение h-bond (3,08). Цефтазидим, кверцетин и рутин можно объединить в общую группу по данному показателю, поскольку различия между их значениями статистически не значимы.

В таблице 3.6 представлены результаты попарных сравнений для показателя ΔG .

Таблица 3.6 - Попарные сравнения для показателя ΔG (критерий Тьюки)

Вещество	Среднее	Цефтазидим (-3,85)	Галловая кислота (-3,43)	Кверцетин (-4,31)	Рутин (0,55)
Цефтазидим	-3,85		<0,001	<0,001	<0,001
Галловая кислота	-3,43	<0,001		<0,001	<0,001
Кверцетин	-4,31	<0,001	<0,001		<0,001
Рутин	0,55	<0,001	<0,001	<0,001	

Примечание: жирным выделены значимые различия

По свободной энергии образования комплекса все вещества статистически значимо различаются ($p < 0,001$). Наиболее прочно связывание характерно для кверцетина ($\Delta G = -4,31$), наименьшее отрицательное значение показателя ΔG у рутина (0,55), что свидетельствует о низких шансах на связывание.

В таблице 3.7 представлены результаты попарных сравнений для показателя K_i .

Таблица 3.7 - Попарные сравнения для показателя K_i (критерий Тьюки)

Вещество	Среднее	Цефтазидим (3899)	Галловая кислота (3136)	Кверцетин (1200)	Рутин (420155)
Цефтазидим	3899		<0,001	<0,001	<0,001
Галловая кислота	3136	<0,001		<0,001	<0,001
Кверцетин	1200	<0,001	<0,001		<0,001
Рутин	420155	<0,001	<0,001	<0,001	

Примечание: жирным выделены значимые различия

Исходя из данных таблицы, можно заключить, что по показателю K_i все вещества имеют статистически значимые различия ($p < 0,00$). Наименьшее значение K_i отмечено у кверцетина (1200 μM), что говорит о возможном наиболее эффективном ингибировании роста, крайне низкие шансы на связывание у рутина ($K_i=420155 \mu\text{M}$).

В таблице 3.8 представлены результаты попарных сравнений для показателя LE.

Таблица 3.8 - Попарные сравнения для показателя LE (критерий Тьюки)

Вещество	Среднее	Цефтазидим (-0,102)	Галловая кислота (-0,288)	Кверцетин (-0,189)	Рутин (-0,020)
Цефтазидим	-0,102		<0,001	<0,001	<0,001
Галловая кислота	-0,288	<0,001		<0,001	<0,001
Кверцетин	-0,189	<0,001	<0,001		<0,001
Рутин	-0,020	<0,001	<0,001	<0,001	

Примечание: жирным выделены значимые различия

Показатель LE характеризуется статистически значимыми различиями для всех исследуемых веществ ($p < 0,001$). У рутина значение LE наиболее близкое к нулю (-0,020). При положительном значении ΔG связывания происходить не будет. У галловой кислоты отмечено наиболее отрицательное значение LE (-0,288), что при имеющихся благоприятных значениях ΔG свидетельствует о неоптимальном использовании атомов.

В таблице 3.9 представлены результаты попарных сравнений для показателя ΔE .

Таблица 3.9 - Попарные сравнения для показателя ΔE (критерий Тьюки)

Вещество	Среднее	Цефтазидим (-3,22)	Галловая кис- лота (-2,67)	Кверцетин (-0,206)	Рутин (-0,18)
Цефтазидим	-3,22		<0,001	<0,001	<0,001
Галловая кислота	-2,67	<0,001		<0,001	<0,001
Кверцетин	-0,206	<0,001	<0,001		0,982
Рутин	-0,18	<0,001	<0,001	0,982	

Примечание: жирным выделены значимые различия

Анализ данных таблицы позволяет говорить о статистически значимых различиях ($p < 0,001$) по данному показателю между парами цефтазидима с галловой кислотой (имеют существенно более отрицательные значения ΔE) и кверцетина с рутином. Различия между рутином и кверцетином по ΔE статистически не значимы ($p = 0,982$), а значения ΔE близки к нулю.

В таблице 3.10 приведены обобщенные результаты попарных сравнений.

Таблица 3.10 - Сводная таблица значимости различий между веществами

Показатель	цефтазидим / галловая к- та	цефтазидим / кверцетин	цефтазидим / рутин	галловая к- та / квер- цетин	галловая к-та / ру- тин	кверцетин / рутин
h-bond	<0,001	0,694	0,738	0,011	0,003	0,363
ΔG	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Ki	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
LE	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ΔE	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,982

Примечание: жирным выделены значимые различия

Оценка данных многомерного дисперсионного анализа позволяет заключить о наличии высоко значимых ($p < 0,001$) различий между исследуемыми веществами по всем показателям. Результаты одномерного анализа говорят о том, что все показатели, включенные в анализ, вносят статистически значимый вклад ($p < 0,001$) в дифференциацию веществ.

Наибольшей дискриминирующей способностью обладает показатель LE ($F = 246,98$);

- пост-хок анализ (критерий Тьюки) выявил следующие закономерности: по показателям ΔG , K_i и LE все вещества значимо различаются между собой; по h-bond галловая кислота значимо отличается от всех остальных веществ, тогда как цефтазидим, кверцетин и рутин образуют однородную группу; по ΔE цефтазидим и галловая кислота значимо отличаются от кверцетина и рутина, но между кверцетином и рутином различия отсутствуют.

Ранжирование веществ по эффективности связывания на основании комплекса показателей: кверцетин - наиболее эффективное связывание с белками-мишенями (наиболее отрицательная ΔG , наименьшая K_i , стабильные кластеры); цефтазидим и галловая кислота - умеренно эффективны, с различными профилями (цефтазидим - более отрицательная ΔE , галловая кислота - больше h-bond); рутин - наименее эффективен (положительная ΔG , экстремально высокая K_i).

Достоверность результатов обеспечена достаточным объемом выборки ($n = 50$) и высокими уровнями значимости ($p < 0,001$ для большинства сравнений).

3.6.4 Анализ распределения показателей по кластерам внутри веществ

Для более детального понимания характера связывания исследуемых веществ с белком-мишенью был проведён анализ распределения показателей эффективности по отдельным кластерам внутри каждого вещества. Как отмечалось ранее, в процессе молекулярного докинга для каждого вещества было выделено по пять кластеров, соответствующих различным ориентациям молекулы в активном центре. Однако для корректной статистической обработки номера кластеров были искусственно сдвинуты: цефтазидиму соответствуют кластеры 1-5, галловой кислоте - 6-10, кверцетину - 11-15, рутину - 16-20.

Анализ распределения по кластерам внутри веществ позволяет выяснить, существуют ли кластеры, обеспечивающие более эффективное связывание; насколько

ко стабильны показатели внутри каждого кластера; имеются ли явно предпочтительные ориентации для каждого вещества.

Ниже представлены описательные статистики (среднее $\pm$ стандартное отклонение) для каждого показателя в разрезе кластеров. Данные рассчитаны на основе 50 измерений для каждого вещества с учётом фактического распределения по кластерам.

Анализ распределения цефтазидима по кластерам (таблица 3.11) показывает, что наиболее предпочтительной ориентацией является кластер 3, который не только доминирует количественно (25 наблюдений из 50), но и характеризуется наиболее стабильными показателями, особенно по энергии взаимодействия ΔE .

Таблица 3.11 - Цефтазидим: описательная статистика по кластерам ($M \pm SD$)

Кластер	n	h-bond	ΔG , ккал/моль	K_i , μM	LE	ΔE
1	6	$1,33 \pm 1,03$	$-4,26 \pm 1,12$	1670 ± 1786	$-0,117 \pm 0,029$	$-2,13 \pm 0,69$
2	9	$2,11 \pm 0,60$	$-3,45 \pm 0,75$	7290 ± 11685	$-0,094 \pm 0,021$	$-2,94 \pm 1,07$
3	25	$2,48 \pm 0,82$	$-4,00 \pm 0,78$	2203 ± 2469	$-0,109 \pm 0,024$	$-4,15 \pm 0,69$
4	5	$2,40 \pm 1,67$	$-3,79 \pm 1,57$	11256 ± 23685	$-0,102 \pm 0,034$	$-2,42 \pm 0,71$
5	5	$2,20 \pm 0,84$	$-3,54 \pm 0,47$	2988 ± 1740	$-0,095 \pm 0,011$	$-2,86 \pm 0,55$

Для цефтазидима, кластер 1 несмотря на малочисленность, демонстрирует наиболее отрицательную энергию связывания, что может указывать на высокую степень аффинности к белку. Кластер 2 характеризуется крайне высоким разбросом значений константы ингибирования. Это может свидетельствовать о нестабильности ингибирующей активности в данной ориентации. Кластеры 4 и 5 представлены небольшим числом конформаций, демонстрируют неблагоприятные для связывания энергетические характеристики, и, вероятно, соответствуют неоптимальным способам связывания.

Для галловой кислоты отмечается абсолютное доминирование конформаций в кластере 8 (3) (таблица 3.12). Здесь фиксируется 46 из 50 исследуемых конформаций со стабильными значениями по всем показателям и с минимальными разбросами значений.

Таблица 3.12- Галловая кислота: описательная статистика по кластерам ($M \pm SD$)

Кластер	n	H-bond	ΔG , ккал/моль	K_i , μM	LE	ΔE
6	1	3,00	-3,56	2480	-0,30	-1,45
7	1	2,00	-3,44	2990	-0,29	-1,65
8	46	$3,20 \pm 0,83$	$-3,44 \pm 0,17$	3176 ± 827	$-0,29 \pm 0,02$	$-2,69 \pm 0,54$
9	1	2,00	-3,18	4630	-0,27	-1,96
10	1	2,00	-3,12	5150	-0,26	-1,30

Галловая кислота имеет явно выраженную предпочтительную ориентацию в активном центре, что может обеспечить стабильное связывание с белком-мишенью. Значения исследуемых показателей в остальных кластерах несколько менее энергетически благоприятны, однако малая их представленность не позволяет делать статистически значимые выводы. Таким образом можно заключить о высокой специфичности связывания галловой кислоты с белком-мишенью и говорить о четко выраженной доминирующей ориентации молекулы.

В таблице 3.13 представлен анализ распределения показателей связывания кверцетина. Основная масса конформаций приходится на два кластера: 11 (1) и 12 (2).

Таблица 3.13 - Кверцетин: описательная статистика по кластерам ($M \pm SD$)

Кластер	n	h-bond	ΔG , ккал/моль	K_i , μM	LE	ΔE
11	17	$1,88 \pm 1,11$	$-4,28 \pm 0,51$	902 ± 704	$-0,20 \pm 0,02$	$-0,18 \pm 0,09$
12	13	$2,85 \pm 1,07$	$-5,14 \pm 0,52$	188 ± 166	$-0,23 \pm 0,03$	$-0,27 \pm 0,11$
13	1	3,00	-3,49	2750	-0,16	-0,10
14	7	$2,14 \pm 1,46$	$-3,91 \pm 0,44$	2093 ± 2081	$-0,18 \pm 0,02$	$-0,26 \pm 0,14$
15	2	$2,50 \pm 2,12$	$-3,73 \pm 0,75$	2636 ± 2669	$-0,17 \pm 0,03$	$-0,14 \pm 0,01$

При этом кластер 12 (2) характеризуется наибольшей отрицательной свободной энергией образования комплекса и минимальными значениями константы ингибирования, а также возможность образования большого количества водородных связей, что является предпосылками к наиболее эффективному связыванию. Кластер 11 (1) уступает кластеру 12 (2) по всем ключевым показателям эффективности. Остальные кластеры (13-15) (3,4,5) малочисленны и характеризуются худши-

ми энергетическими характеристиками, что позволяет рассматривать их как неоптимальные ориентации. Таким образом, для реализации максимальной эффективности кверцетина критически важна его ориентация именно в кластере 13 (3).

Для рутина (таблица 3.14) характерна принципиально иная картина. Во всех кластерах наблюдается огромный разброс константы ингибирования, измеряемый сотнями тысяч, что указывает на крайне нестабильный, случайный характер связывания.

Таблица 3.14 - Рутин: описательная статистика по кластерам ($M \pm SD$)

Кластер	n	h-bond	ΔG , ккал/моль	K_i , μM	LE	ΔE
16	7	$1,14 \pm 1,21$	$0,44 \pm 0,90$	531445 ± 379234	$-0,02 \pm 0,02$	$-0,17 \pm 0,10$
17	10	$1,50 \pm 1,27$	$0,11 \pm 0,90$	471992 ± 303268	$-0,02 \pm 0,02$	$-0,23 \pm 0,12$
18	4	$1,50 \pm 1,29$	$-0,09 \pm 0,96$	540893 ± 317434	$-0,02 \pm 0,02$	$-0,21 \pm 0,07$
19	9	$1,00 \pm 1,22$	$0,74 \pm 1,04$	469415 ± 316905	$-0,02 \pm 0,02$	$-0,15 \pm 0,19$
20	3	$0,33 \pm 0,58$	$-0,34 \pm 1,53$	534850 ± 340057	$-0,02 \pm 0,03$	$-0,22 \pm 0,07$

В большинстве кластеров свободная энергия связывания принимает положительные значения, свидетельствуя о термодинамической невыгодности комплексообразования. Лишь в кластерах 18 (3) и 20 (5) зафиксированы отрицательные значения ΔG , однако они сопровождаются высоким разбросом и крайне низкой воспроизводимостью, а малочисленность этих кластеров не позволяет рассматривать их как значимые. Таким образом, для рутина все кластеры эквивалентны в своей неэффективности - отсутствие стабильного специфического связывания подтверждается на уровне анализа отдельных ориентаций.

3.6.5 Сравнение отдельных кластеров

Для проверки значимости различий между кластерами, обеспечивающими наилучшее и наихудшее связывание, был проведён t-тест для показателя свободной энергии образования комплекса ΔG . Сравнивались кластеры с наиболее и наименее отрицательными средними значениями внутри каждого вещества (таблица 3.15).

Таблица 3.15 - Сравнение наиболее и наименее эффективных кластеров по ΔG (t-критерий Стьюдента)

Вещество	Лучший кластер (ΔG)	Худший кластер (ΔG)	t	p	Значимость
Цефтазидим	Кл. 1 ($-4,26 \pm 1,12$)	Кл. 2 ($-3,45 \pm 0,75$)	2,14	0,046	значимо
Галловая кислота	Кл. 6 ($-3,56$)	Кл. 10 ($-3,12$)	-	-	выборки малы
Кверцетин	Кл. 12 ($-5,14 \pm 0,52$)	Кл. 14 ($-3,91 \pm 0,44$)	5,62	<0,001	высоко значимо
Рутин	Кл. 20 ($-0,34 \pm 1,53$)	Кл. 19 ($0,74 \pm 1,04$)	1,31	0,212	не значимо

Примечание: для галловой кислоты сравнение не проводилось из-за недостаточного размера выборок в кластерах 6 и 10.

Проведенный анализ определил статистически значимые различия ($p < 0,05$) между наиболее и наименее эффективными кластерами цефтазидима, подтвердив влияние ориентации молекулы на эффективность связывания. У кверцетина существует высокоэффективная ориентация в кластере 12 ($p < 0,001$). Для рутина же, различия в кластерах статистически не значимы, что согласуется с фактом отсутствия стабильного специфического связывания. У галловой кислоты выражено доминирование кластера 8, не идущее в сравнение с единичными конформациями в других кластерах.

3.6.6 Анализ методом главных компонент (PCA)

Для визуализации многомерных данных и выявления скрытых закономерностей был проведён PCA (Principal Component Analysis). Данный метод позволил снизить количество исходных определяющих показателей до двух-трёх главных компонент. При этом был сохранен максимально возможный объём информации. Каждая точка на полученных графиках соответствует одному измерению, а близость точек свидетельствует о сходстве свойств. На рисунке 3.34 представлен график «каменистая осыпь», показывающий, какой процент общей дисперсии (изменчивости) данных объясняет каждая главная компонента.

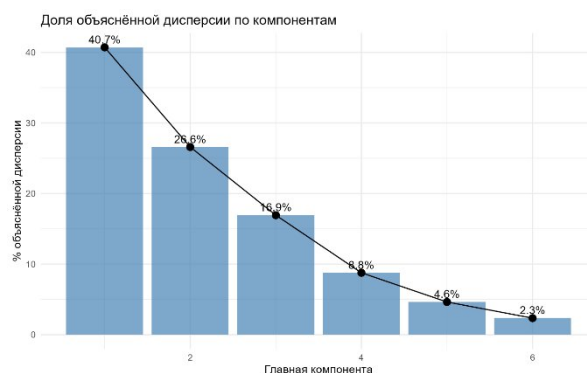


Рисунок 3.34- Доля объяснённой дисперсии главных компонент

Анализируя данный график можно заключить о том, что первая главная компонента (PC1) объясняет 40,7% общей дисперсии, вторая главная компонента (PC2) - 26,6%, а суммарно первые две компоненты описывают 67,3% всей информации, содержащейся в шести исходных показателях.

Третья и последующие компоненты вносят существенно меньший вклад (16,9%, 8,8%, 4,6% и 2,3% соответственно) и могут быть исключены из дальнейшего рассмотрения без существенной потери информации. Ввиду вышеизложенного, для визуализации и интерпретации будет достаточно рассмотреть плоскость первых двух главных компонент.

На графике (рисунок 3.35) собраны расположения 200 конформаций (по 50 для каждого исследуемого вещества) сосредоточенных в координатах первых двух главных компонент. Анализ, позволяет выделить три основные группы.

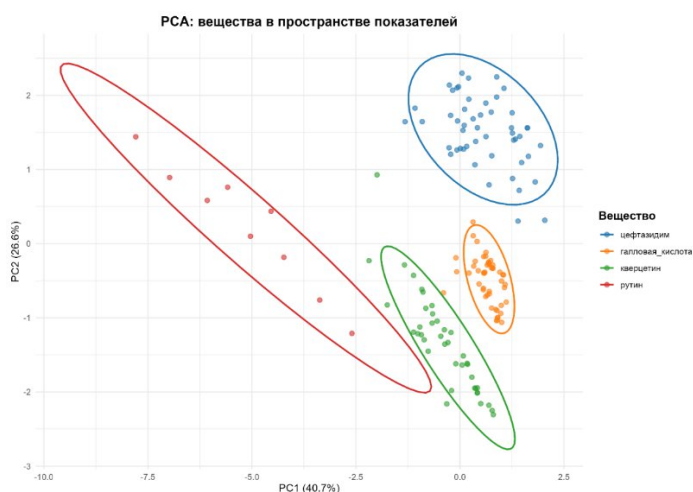


Рисунок 3.35 - Распределение исследуемых веществ в пространстве первых двух главных компонент

Примечание: эллипсами показаны 95% доверительные области для каждого вещества.

1 группа – цефтазидим (синие точки). Он занимает компактную область в левой части графика и характеризуется отрицательными значениями по обоим компонентам. Стабильность измерений для данного вещества обеспечивается высокой плотностью точек и небольшим разбросом.

2 группа – галловая кислота (оранжевые точки). Располагается в правой части графика, имеет 2 подгруппы. Большая часть конформаций занимает положительную область значений PC1 и значений PC2. Небольшой процент точек занимает область отрицательных значений PC2, соответствующих кластерам 6,7,9 и 10.

3 группа – кверцетин (зеленые точки) и рутин (красные точки). Данные вещества занимают обособленное положение в верхней части графика, демонстрируя положительные значения PC2. Отмечается частичное перекрывание этих двух веществ, из чего можно заключить о наличии определенного сходства между ними во взаимодействии с белком-мишенью. Тем не менее большая часть конформаций кверцетина смещена в область отрицательных значений PC1, в отличие от рутина.

Статистическая значимость наблюдаемых различий подтверждается доверительными эллипсами (95%). Эллипсы исследуемых веществ практически не перекрываются, что указывает на имеющиеся достоверные различия между этими группами веществ.

На графике (рисунок 3.36) представлены нагрузки исходных показателей на первые две главные компоненты. Направление стрелок отражает характер корреляционной зависимости, а длина каждой стрелки пропорциональна вкладу показателя в формирование компонент.

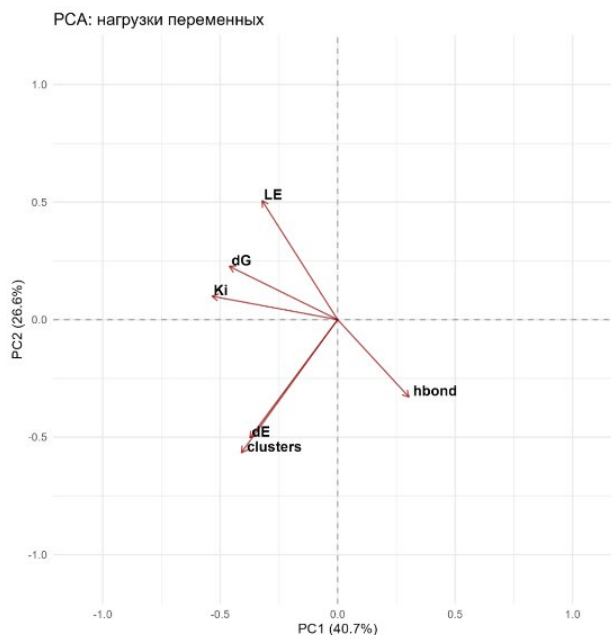


Рисунок 3.36 - Нагрузки переменных на первые две главные компоненты

Горизонтальная ось – 40,7% дисперсии – PC1. Высокие значения LE и h-bond определяют положительные значения PC1. Отрицательные значения PC1 связаны с высокими значениями показателя Кластеры, ΔG и K_i . Ось PC1 можно интерпретировать, как ось, разделяющую вещества с высокой эффективностью лиганда и большим количеством водородных связей (положительная область), а также вещества с высокой вариабельностью кластеров и более отрицательной свободной энергией связывания (отрицательная область).

Интерпретация PC2 (вертикальная ось, 26,6% дисперсии). Положительные значения PC2 связаны с высокими значениями LE и, в меньшей степени, ΔG . Отрицательные значения PC2 определяются, прежде всего, показателем clusters, а также h-bond. PC2 можно интерпретировать как ось, отражающую специфичность связывания: положительная область соответствует более эффективным и специфичным взаимодействиям, отрицательная - более вариабельным и менее специфичным.

Взаимное расположение переменных:

- показатели ΔG и K_i расположены близко друг к другу, что подтверждает их тесную корреляцию (как и следовало ожидать из термодинамических соотношений);

- показатель clusters противопоставлен показателям LE и h-bond, что согласуется с биологическим смыслом: высокая вариабельность кластеров (большое число кластеров) обычно не сочетается с высокой эффективностью лиганда;

- ΔE занимает обособленное положение, указывая на его специфический вклад, не сводимый к другим показателям.

На рисунке 3.37 представлен biplot, объединяющий информацию о расположении веществ и нагрузках переменных. Данный график дает представление о показателях, характерных для конкретного вещества. Цефтазидим характеризуется высокими значениями clusters (вариабельность ориентаций) и умеренными значениями ΔG . Галловая кислота демонстрирует высокие значения h-bond и LE. Кверцетин описывается областью, определяемой ΔG и K_i , что подтверждает его высокую аффинность. Для рутина характерно расположение в области начала координат, что отражает его «средние» (фактически - невыраженные) характеристики по всем показателям.

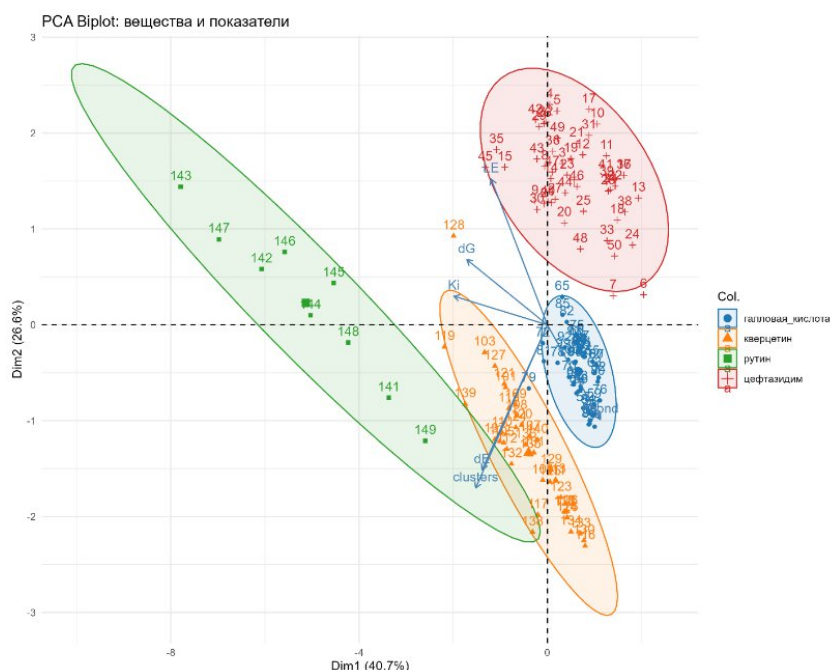


Рисунок 3.37 - Biplot: совместное отображение веществ и показателей

Заключения по результатам PCA.

1. Первые две главные компоненты объясняют 67,3% общей дисперсии данных. Это является хорошим показателем для визуализации и интерпретации.

2. Результаты MANOVA и одномерных тестов подтверждают чёткое разделение цефтазидима, галловой кислоты и пары кверцетин-рутин.

3. Кверцетин и рутин занимают различные области пространства главных компонент, несмотря на частичное перекрывание. Это указывает на различия в механизмах их взаимодействия с белком.

4. Анализ нагрузок переменных содержательно интерпретировал главные компоненты и выявил основные закономерности: противопоставление кластерной вариабельности и эффективности лиганда, корреляцию ΔG и K_i , специфическую роль водородных связей.

5. PCA предоставила наглядную многомерную визуализацию различий между исследуемыми веществами, подтвердив и дополнив результаты предшествующего статистического анализа.

3.6.7 Оценка влияния типа вещества на исследуемые показатели эффективности

С целью количественной оценки влияния типа вещества на исследуемые показатели эффективности был проведён множественный регрессионный анализ (multiple linear regression, MLR). Данный анализ позволяет оценить величину различий в натуральных единицах измерения каждого показателя и выявить статистически значимые различия между веществами.

В качестве базового уровня и препарата сравнения был выбран цефтазидим. Для трёх остальных веществ (галловая кислота, кверцетин, рутин) были созданы фиктивные переменные (dummy variables), принимающие значение 1 для соответствующего вещества и 0 в противном случае. Таким образом, полученные коэффициенты регрессии (таблица 3.16) показывают, на сколько единиц изменяется данный показатель при переходе от цефтазидима к соответствующему веществу.

Были построены шесть регрессионных моделей - по одной для каждого показателя: свободной энергии образования комплекса (ΔG), натурального логарифма константы ингибирования ($\ln K_i$), эффективности лиганда (LE), количества водо-

родных связей (h-bond), энергии межмолекулярного взаимодействия (ΔE) и числа кластеров.

Таблица 3.16 - Коэффициенты множественной линейной регрессии (estimate $\pm$ std. error)

Показатель	Галловая кислота	Кверцетин	Рутин	R ²	F
ΔG , ккал/моль	0,414 $\pm$ 0,128 **	-0,557 $\pm$ 0,136 ***	3,116 $\pm$ 0,232 ***	0,635	84,0
ln(Ki)	0,699 $\pm$ 0,216 **	-0,940 $\pm$ 0,230 ***	5,256 $\pm$ 0,392 ***	0,635	84,0
LE	-0,186 $\pm$ 0,008 ***	-0,090 $\pm$ 0,008 ***	0,086 $\pm$ 0,014 ***	0,836	247,0
h-bond	0,920 $\pm$ 0,207 ***	0,240 $\pm$ 0,220	-0,382 $\pm$ 0,375	0,151	8,6
ΔE	0,547 $\pm$ 0,145 ***	3,004 $\pm$ 0,153 ***	2,922 $\pm$ 0,262 ***	0,767	159,5
Кластеры	5,120 $\pm$ 0,204 ***	9,220 $\pm$ 0,216 ***	14,898 $\pm$ 0,369 ***	0,950	913,6

Примечание: * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Базовый уровень - цефтазидим. Жирным выделены коэффициенты, соответствующие улучшению показателя относительно цефтазидима (для ΔG и Ki улучшением является отрицательное значение, для LE и h-bond - положительное).**

Для наглядного представления полученных коэффициентов на рисунке 3.38 показано изменение свободной энергии образования комплекса ΔG относительно цефтазидима.

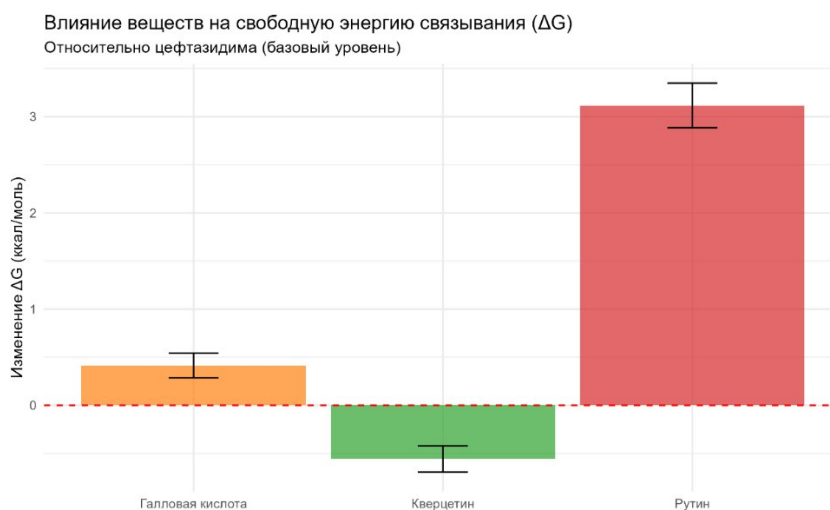


Рисунок 3.38 - Изменение свободной энергии образования комплекса (ΔG) относительно цефтазидима

Положительные значения соответствуют ухудшению (менее отрицательная ΔG), отрицательные - улучшению (более отрицательная ΔG). Планки погрешностей - стандартные ошибки коэффициентов.

Приведем интерпретацию результатов по показателям

1. Свободная энергия образования комплекса (ΔG).

Отрицательные значения ΔG соответствуют более прочному связыванию. Анализ регрессионной модели показывает:

- кверцетин демонстрирует статистически значимое улучшение свободной энергии связывания относительно цефтазида на 0,56 ккал/моль ($p < 0,001$); это означает, что комплекс кверцетина с белком стабильнее, чем комплекс цефтазида, в среднем на 0,56 ккал/моль;

- галловая кислота характеризуется незначительным ухудшением показателя (ΔG выше на 0,41 ккал/моль, $p < 0,01$), что соответствует несколько менее прочному связыванию;

- рутин показывает драматическое ухудшение: ΔG возрастает на 3,12 ккал/моль ($p < 0,001$), что свидетельствует о крайне слабом, термодинамически невыгодном связывании.

2. Константа ингибирования ($\ln K_i$).

Поскольку K_i обратно пропорциональна эффективности ингибирования, отрицательные коэффициенты указывают на улучшение (снижение K_i). Для удобства интерпретации коэффициенты преобразованы в отношение K_i вещества к K_i цефтазида (таблица 3.17).

Таблица 3.17 - Преобразование в отношение K_i вещества к K_i цефтазида

Вещество	Изменение $\ln K_i$	Отношение $K_i(\text{вещество})/K_i(\text{цефтазид})$	Эффективность
Галловая кислота	+0,699	в 2,01 раза выше	хуже в 2 раза
Кверцетин	-0,940	в 2,56 раза ниже	лучше в 2,6 раза
Рутин	+5,256	в 191,6 раза выше	хуже в 192 раза

Таким образом, для достижения того же ингибирующего эффекта кверцетина требуется в 2,6 раза меньшая концентрация, чем цефтазидима, тогда как для рутина - в 192 раза большая.

3. Эффективность лиганда (LE).

Показатель LE должен быть максимально высоким (ближе к нулю). Полученные коэффициенты показывают:

- галловая кислота имеет значительно более низкий LE (на 0,186, $p < 0,001$), что указывает на неоптимальное использование атомов молекулы для связывания;
- кверцетин также уступает цефтазидиму, но в меньшей степени (на 0,090, $p < 0,001$);
- рутин формально показывает улучшение LE (+0,086, $p < 0,001$), однако, учитывая положительную ΔG , этот результат не может интерпретироваться как преимущество - высокая эффективность лиганда не имеет смысла при отсутствии стабильного связывания.

4. Водородные связи (h-bond):

- галловая кислота образует значимо больше водородных связей, чем цефтазидим - в среднем на 0,92 связи ($p < 0,001$); это согласуется с её химической структурой, содержащей несколько гидроксильных групп;
- кверцетин и рутин не демонстрируют статистически значимых различий с цефтазидимом по данному показателю ($p > 0,05$).

Низкие значения коэффициента детерминации модели для h-bond ($R^2 = 0,151$) свидетельствуют о том, что тип вещества объясняет лишь 15% вариабельности этого показателя. На 85% изменчивости влияют другие факторы.

5. Общая энергия связывания (ΔE).

Отрицательные значения ΔE характеризуют выгодные межмолекулярные взаимодействия. Все три исследуемых вещества имеют неблагоприятные для эффективного связывания значения данного показателя в сравнении с цефтазидимом. У галловой кислоты ΔE выше, чем у цефтазидима на 0,55 (менее отрицательная), у кверцетина выше на 3,00, у рутина выше на 2,92.

Кверцетин при наилучших значениях ΔG демонстрирует наихудшие значения ΔE . Косвенно это может указывать на то, что стабилизация комплекса кверцетина с белком-мишенью достигается не столько за счёт суммарных межмолекулярных взаимодействий, сколько за счёт специфических эффектов (например, образования уникальных водородных связей или гидрофобных взаимодействий, не полностью учитываемых в ΔE).

6. Кластеры.

Наибольшее количество изменений относительно цефтазида наблюдаются по показателю «Кластеры», с учётом искусственного сдвига номеров кластеров для разных веществ. Коэффициенты регрессии для галловой кислоты фиксируют увеличение на 5,12, для кверцетина увеличение на 9,22, для рутина увеличение на 14,90.

Все выявленные различия являются высоко значимыми ($p < 0,001$), а модель объясняет 95% дисперсии ($R^2 = 0,95$). Это является подтверждением того, что номер кластера практически полностью детерминирован типом вещества (таблица 3.18).

Таблица 3.18 - Метрики качества регрессионных моделей

Показатель	R^2	Скорректированный R^2	F-критерий
ΔG	0,635	0,627	84,0
$\ln K_i$	0,635	0,627	84,0
LE	0,836	0,833	247,0
h-bond	0,151	0,133	8,6
ΔE	0,767	0,763	159,5
Кластеры	0,950	0,949	913,6

Анализ качества регрессионных моделей позволил выявить существенные различия в предсказательной способности использованных предикторов. Значение коэффициента детерминации R^2 выше 0,8 достигнуто для показателей эффективности лиганда и числа кластеров. Это подтверждает, что тип вещества является ключевым фактором, который определяет вариабельность исследуемых показателей, а модель объясняет большую часть наблюдаемых различий.

Для показателей свободной энергии образования комплекса ΔG , логарифма константы ингибирования $\ln K_i$ и энергии межмолекулярного взаимодействия ΔE

R^2 варьируется в диапазоне от 0,6 до 0,8. Это доказывает, что построенные регрессионные уравнения описывают зависимость данных показателей от типа вещества, но часть дисперсии остаётся необъяснённой. Она может быть связана с другими факторами, не учтёнными в модели.

Наименьшее качество продемонстрировала модель для количества водородных связей h-bond с коэффициентом детерминации всего 0,15. Такое низкое значение R^2 указывает на слабую зависимость числа образуемых водородных связей от природы вещества. Очевидно оно определяется такими факторами как конкретная конформация молекулы в момент связывания или микроокружение в активном центре белка.

Для всех построенных моделей F-критерий оказался статистически значимым ($p < 0,001$), что подтверждает адекватность регрессионных уравнений в целом и обосновывает правомерность их использования для анализа исследуемых зависимостей.

В таблице 3.19 предложено ранжирование исследуемых веществ по эффективности взаимодействия с белком-мишенью.

Таблица 3.19 - Ранжирование исследуемых веществ по эффективности взаимодействия с белком-мишенью на основе оцениваемых критериев связывания

Ранг	Вещество	Обоснование
1	Кверцетин	Статистически значимое улучшение ключевых показателей (ΔG и K_i) относительно цефтазида при сохранении сопоставимого уровня водородных связей. Умеренное ухудшение ΔE может указывать на иной, нежели у других веществ, механизм стабилизации комплекса.
2	Цефтазидим	Базовый уровень сравнения. Демонстрирует сбалансированные, но не максимальные показатели. Остаётся референтным соединением для оценки других веществ.
3	Галловая кислота	Смешанный профиль: значимо больше водородных связей, но хуже энергетические характеристики (ΔG , K_i , LE). Может рассматриваться как вещество с иным, более специфичным механизмом связывания, ориентированным на образование водородных связей.
4	Рутин	Категорически уступает цефтазидиму по всем ключевым показателям эффективности. Положительная ΔG и экстремально высокая K_i (в 192 раза выше) свидетельствуют об отсутствии стабильного специфического связывания в исследованных условиях.

Анализируя данные, полученные посредством регрессионного анализа можно заключить, что за исключением h-bond для кверцетина и рутина между всеми исследуемыми веществами установлены статистически значимые различия по всем показателям. Кверцетин выделяется, как наиболее эффективное по способности к связыванию с белком-мишенью соединение (относительно цефтазидима), обеспечивается увеличением ΔG на 0,56 ккал/моль и снижением K_i в 2,6 раза.

Галловая кислота имеет специфический профиль, при менее благоприятных для связывания энергетических показателях она образует значимо больше водородных связей.

Рутин характеризуется крайне низкой степенью аффинности к белкам-мишеням. Его значения K_i в 192 раза превышают значения соответствующего показателя у цефтазидима, а положительная ΔG указывает на термодинамическую невыгодность комплексообразования.

По показателю «Кластеры» достигнуто наилучшее качество предсказания ($R^2 = 0,95$) и LE ($R^2 = 0,84$). Это подтверждает определяющую роль типа вещества в формировании этих характеристик. В отличие от показателя «Кластеры» показатель «h-bond» слабо зависит от природы вещества ($R^2 = 0,15$).

На рисунке 3.39 представлено влияние исследуемых веществ на оцениваемые показатели эффективности, с указанием коэффициентов регрессии для каждого вещества по каждому показателю.

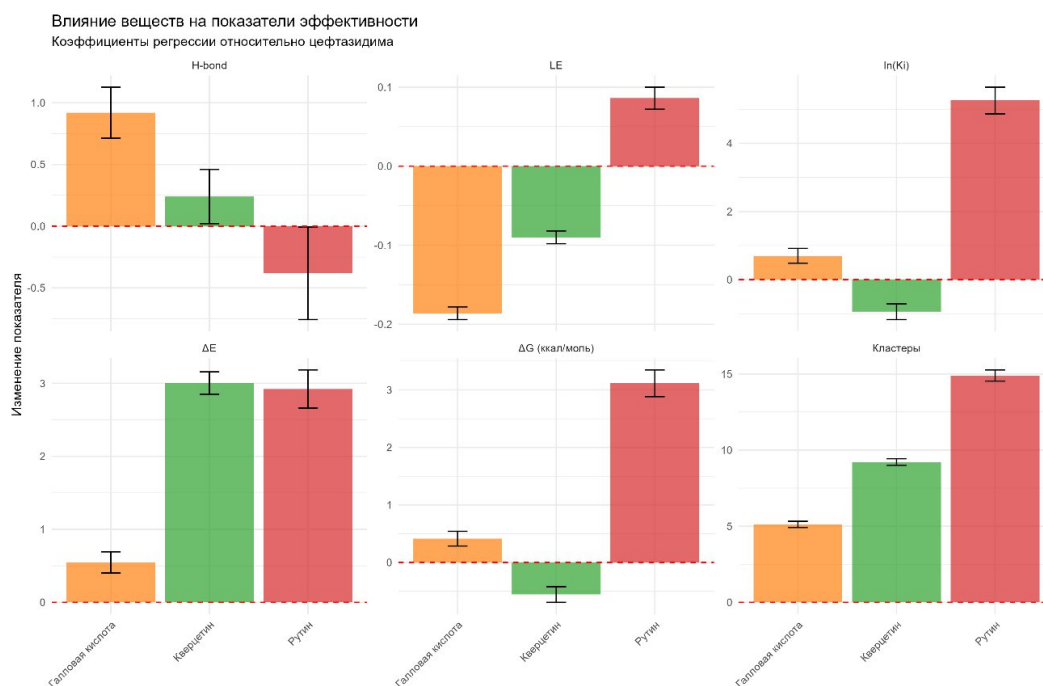


Рисунок 3.39 - Сводный график коэффициентов регрессии для всех показателей

Положительные значения указывают на увеличение показателя относительно цефтазидима, отрицательные - на уменьшение. Для ΔG и K_i уменьшение (отрицательные коэффициенты) соответствует улучшению эффективности.

3.6.8 Анализ влияния молекулярной структуры на активность исследуемых веществ

Предшествующий статистический анализ (MANOVA, множественная регрессия) позволил количественно оценить различия между исследуемыми веществами и ранжировать их по эффективности. Однако для понимания причин наблюдаемых различий необходимо обратиться к структурным особенностям молекул. С этой целью был проведён анализ количественной связи «структура-активность» (Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR), который устанавливает

корреляции между молекулярными дескрипторами соединений и их биологической активностью.

В качестве молекулярных дескрипторов были выбраны следующие характеристики:

- молекулярная масса (MW) - отражает размер молекулы;
- коэффициент липофильности (logP) - характеризует способность вещества растворяться в липидах и проникать через мембраны;
- количество доноров водородной связи (HBD) - способность отдавать протоны;
- количество акцепторов водородной связи (HBA) - способность принимать протоны;
- полярная поверхность (PSA) - мера полярности молекулы;
- количество вращающихся связей (RotB) - характеризует гибкость молекулы.

Все значения дескрипторов были взяты в базе данных PubChem. Она содержит достоверную информацию о физико-химических свойствах химических соединений. Показателями активности выступали средние значения свободной энергии образования комплекса (ΔG) и натурального логарифма константы ингибирования ($\ln K_i$), которые рассчитывались в работе ранее.

Значения молекулярных дескрипторов и активности исследуемых веществ приведены в таблице 3.20.

Таблица 3.20 – Значения молекулярных дескрипторов и активности исследуемых веществ

Вещество	MW	logP	HBD	HBA	PSA	RotB	ΔG , ккал/моль	$\ln K_i$
Цефтазидим	546,6	-1,6	3	9	187	8	-3,85	7,92
Галловая кислота	170,1	0,7	4	5	98	1	-3,43	8,02
Кверцетин	302,2	1,5	5	7	127	1	-4,31	6,92
Рутин	610,5	-0,3	10	16	269	6	+0,55	12,89

Указанные данные дают возможность провести первичный визуальный анализ взаимосвязи между биологической активностью веществ и их структурными

характеристиками. Стоит отметить, что обладая наилучшими энергетическими показателями (наиболее отрицательная ΔG и наименьшая $\ln K_i$), кверцетин имеет достаточно сбалансированные значения большинства молекулярных дескрипторов. Это умеренная молекулярная масса (302,2 Да), оптимальные значения липофильности ($\log P = 1,5$), благоприятные для связывания средние значения количества доноров и акцепторов (5 и 7 соответственно).

Рутин, напротив, показывает крайне низкую эффективность связывания (положительная ΔG и максимальная $\ln K_i$). Он характеризуется наибольшими значениями полярных дескрипторами ($HBD = 10$, $HBA = 16$, $PSA = 269 \text{ \AA}^2$) и максимальную молекулярную массу. Это может свидетельствовать о существовании выраженной зависимости между структурными характеристиками молекул и исследуемыми показателями активности. Чтобы оценить количественно такую взаимосвязь, был проведен корреляционный анализ. Результаты проведенного анализа представлены в таблице 3.21.

Таблица 3.21 - Корреляция дескрипторов с показателями активности

Дескриптор	Корреляция с ΔG	Корреляция с $\ln K_i$
HBD (доноры h-bond)	+0,93	+0,91
HBA (акцепторы h-bond)	+0,90	+0,92
PSA (полярная поверхность)	+0,84	+0,87
MW (молекулярная масса)	+0,61	+0,66
RotB (вращающиеся связи)	+0,37	+0,44
$\log P$ (липофильность)	-0,23	-0,30

Анализ корреляционных связей между молекулярными дескрипторами и показателями активности позволил выявить ряд закономерностей. Наиболее сильная связь отмечена для доноров и акцепторов водородной связи ($\rho > 0,9$). Однако при этом, увеличение числа групп, способных образовывать водородные связи, приводит к росту ΔG . Ярким примером такой тенденции является рутин. При значениях $HBD=10$ и $HBA=16$ значения свободной энергии образования комплекса для него в большинстве случаев положительные.

Высокую корреляцию с активностью демонстрирует показатель полярная поверхность (PSA) ($\rho \approx 0,85$). Отмечается, что с увеличением полярной поверхности вещества ухудшается связь молекулы с белком-мишенью. Самым простым

объяснением тому может быть то, что избыточная полярность препятствует эффективному проникновению лиганда в активный центр.

Показатель липофильность ($\log P$), напротив, демонстрирует умеренную отрицательную корреляцию ($\rho \approx -0,2 \dots -0,3$). Это говорит о том, что повышение липофильности будет способствовать более эффективному связыванию. Примером тому является кверцетин. При наибольшем значении $\log P$ (1,5), в сравнении с другими исследуемыми веществами, он демонстрирует наилучшую энергию связывания.

Значения молекулярной массы и количества вращающихся связей имеют умеренную корреляцию с активностью, однако в любом правиле отмечаются исключения. Так рутин, характеризующийся максимальными значениями этих дескрипторов, показывает наихудшие результаты по всем показателям эффективности.

Чтобы иметь наглядное представление о выявленных зависимостях между структурными характеристиками веществ и их биологической активностью был проведён графический анализ. Результаты анализа представлены на рисунках 3.40-3.42.

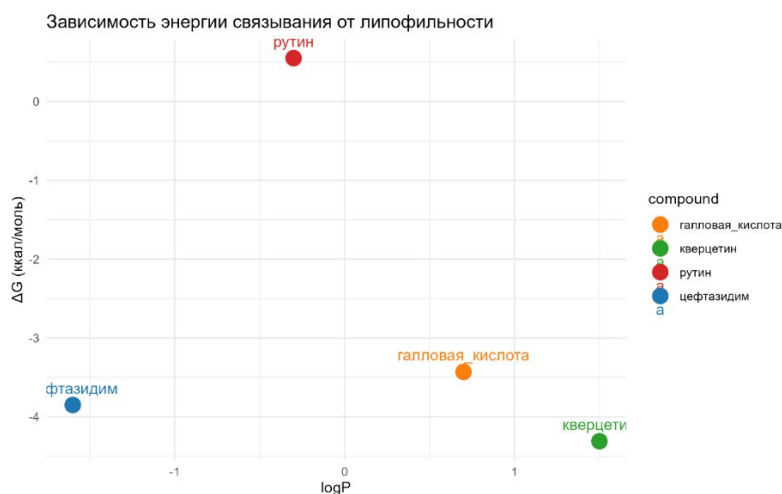


Рисунок 3.40 - Зависимость свободной энергии образования комплекса (ΔG) от липофильности ($\log P$)

Рисунок 3.40 показывает, что, обладая оптимальным значением $\log P$ (1,5), кверцетин демонстрирует наиболее отрицательную, а значит наилучшую энергию связывания с белками-мишенями. Цефтазидин с $\log P = -1,6$ и рутин с $\log P = -0,3$

являются более гидрофильными и уступают кверцетину по эффективности, как и галловая кислота с $\log P = 0,7$. Это подтверждает существование оптимального диапазона липофильности для проявления биологической активности.

Рисунок 3.41 наглядно демонстрирует выделение рутина на общем фоне остальных веществ по всем полярным дескрипторам (HBD, HBA, PSA). Возможно, именно «полярная» избыточность негативно сказывается на эффективности его связывания с белками-мишенями. Кверцетин же, напротив, имеет сбалансированные значения всех дескрипторов и характеризуется высокой активностью.

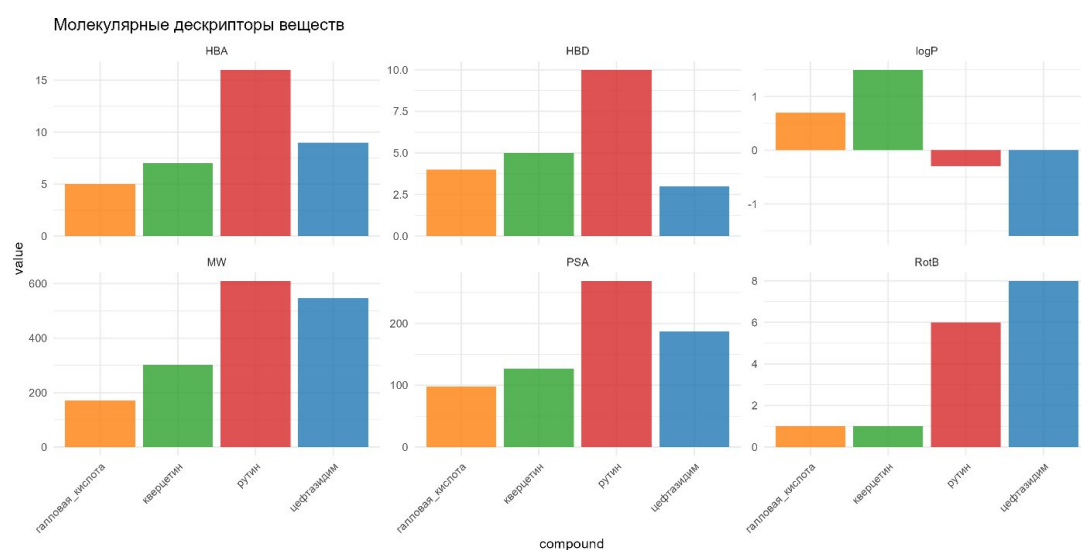


Рисунок 3.41 - Сравнение молекулярных дескрипторов исследуемых веществ

Полученные данные достаточно наглядно описываются построенной регрессионной моделью (рисунок 3.42) с двумя предикторами ($\log P$ и HBD). Все точки располагаются вблизи линии идеального соответствия. Наибольшее отклонение отмечается у галловой кислоты. Это может свидетельствовать о наличии дополнительных факторов, которые не были учтены в модели.

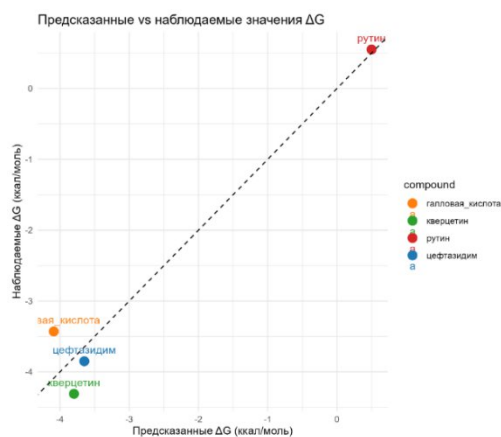


Рисунок 3.42 - Сравнение предсказанных и наблюдаемых значений свободной энергии связывания

Модель: $\Delta G \sim \log P + HBD$. Пунктирная линия - линия идеального соответствия

Опираясь на данные корреляционного анализа, была построена множественная регрессионная модель (формула 1):

$$\Delta G = -4.12 + 0.31 * HBD + 0.45 * \log P, \quad (1)$$

$R^2 = 0.92$; скорректированный $R^2 = 0.76$; $p < 0.05$.

Коэффициенты модели отражают, как увеличение числа доноров водородной связи на 1 приводит к росту ΔG на 0,31 ккал/моль, то есть ухудшает связывание. В отношении липофильности отмечается схожая ситуация. Так увеличение данного показателя на 1 единицу $\log P$ приводит к росту ΔG на 0,45 ккал/моль, однако такой эффект не обязательно линеен.

Ключевые структурные факторы, выявленные посредством QSAR-анализа, позволили определить эффективность связывания исследуемых веществ с белком-мишенью. Первостепенно важными оказались показатели количества доноров и акцепторов водородной связи, а также полярная поверхность вещества. Установлена закономерность, описывающая ухудшение энергии связывания при увеличении этих показателей сверх оптимального уровня ($HBD > 5$, $HBA > 7$, $PSA > 130 \text{ \AA}^2$). Существенную роль играет липофильность веществ. Так оптимум значения $\log P$ равен 1,5, как в случае с кверцетином. Отмечено, что избыток гидрофильности и

липофильности могут привести к снижению активности вещества, хотя в исследованном наборе соединений последний случай не представлен.

Анализ полученных результатов позволяет сформулировать профиль «идеального ингибитора» для исследуемых белков-мишеней. Данное вещество должно иметь умеренное количество доноров (3-5) и акцепторов (5-7) водородной связи, полярную поверхность в диапазоне 100-150 Å², значение logP около 1,5 и молекулярную массу не более 350 Да.

Кверцетин демонстрирует наиболее полное соответствие описанному профилю, что согласуется с его наилучшей активностью (в сравнении с другими исследуемыми веществами). Рутин же, напротив, отступает от «структурного оптимума», имеет большую молекулярную массу и обладает экстремальными значениями полярных дескрипторов, что заметно отражается на его активности.

3.7 Заключение по статистическому анализу данных квантового моделирования

Проведённое исследование, включающее комплекс методов параметрической и многомерной статистики, было направлено на сравнительный анализ эффективности четырёх веществ - цефтазидима, галловой кислоты, кверцетина и рутина - во взаимодействии с белком-мишенью. На основании полученных результатов можно сформулировать следующие выводы.

1. Многомерный дисперсионный анализ (MANOVA) подтвердил наличие высоко значимых различий между исследуемыми веществами по всему комплексу показателей (критерий Уилкса = 0,00087; $F = 244,28$; $p < 0,001$). Это свидетельствует о том, что исследуемые соединения обладают принципиально различными профилями эффективности.

2. Одномерный анализ (ANOVA) показал, что все пять включённых в анализ показателей (h-bond, ΔG , Ki, LE, ΔE) вносят статистически значимый вклад в дифференциацию веществ ($p < 0,001$). Наибольшей дискриминирующей способностью

обладает показатель эффективности лиганда LE ($F = 246,98$), наименьшей - количество водородных связей h-bond ($F = 8,60$).

3. Пост-хок анализ (критерий Тьюки) выявил следующие закономерности в попарных сравнениях:

- по свободной энергии образования комплекса (ΔG), константе ингибирования (K_i) и эффективности лиганда (LE) все вещества значимо различаются между собой ($p < 0,001$ для большинства пар);

- по количеству водородных связей галловая кислота значимо отличается от всех остальных веществ, тогда как цефтазидим, кверцетин и рутин образуют однородную группу;

- по энергии межмолекулярного взаимодействия (ΔE) цефтазидим и галловая кислота значимо отличаются от кверцетина и рутина, однако между кверцетином и рутином различия отсутствуют ($p = 0,982$).

4. Проведенный анализ распределения по кластерам внутри каждого вещества позволил выделить предпочтительные ориентации молекул. Так для цефтазидима доминирующим является кластер III (для RBP 3), где фиксировались 25 из 50 исследуемых конформаций. У галловой кислоты в III кластере отмечено 46 из 50 исследуемых конформаций (высокая специфичность связывания). У кверцетина наилучшие показатели отмечаются во II кластере (наиболее отрицательная ΔG и минимальная K_i). В случае с рутином во всех кластерах фиксируются крайне нестабильные показатели и положительные значения ΔG , что подтверждает отсутствие специфического связывания.

5. С помощью метода главных компонент (PCA) были визуализированы многомерные различия между веществами. Две первые компоненты объясняли 67,3% общей дисперсии. На диаграммах наблюдается чёткое разделение всех исследуемых веществ, что согласуется с результатами дисперсионного анализа. Через анализ нагрузок переменных удалось выявить противопоставление кластерной вариабельности и эффективности лиганда, и корреляцию между ΔG и K_i .

6. Множественный регрессионный анализ дал количественную оценку эффективности связывания каждого фитометаболита в сравнении с антибиотиком

цефтазидимом, который был выбран в качестве модели сравнения. Кверцетин обеспечивает статистически значимое улучшение энергии связывания на 0,56 ккал/моль ($p < 0,001$), а показатели константы ингибирования K_i ниже средних значений других исследуемых веществ в 2,6 раза. Это свидетельствует о высоких шансах на связывание с белками-мишенями. Для галловой кислоты характерны менее выгодные, с термодинамической точки зрения, показатели энергии образования комплекса ΔG (+0,41 ккал/моль), однако она образует значительно больше водородных связей, в сравнении с другими исследуемыми веществами (+0,92). Рутин демонстрирует менее благоприятные для связывания показатели. K_i выше в 192 раза в сравнении с другими исследуемыми веществами, при низких значениях ΔG .

7. С помощью QSAR-анализа были выявлены ключевые структурные факторы, влияющие на эффективность связывания. Наибольшая корреляция с активностью отмечается у доноров и акцепторов водородной связи ($\rho > 0,9$) и полярной поверхности ($\rho \approx 0,85$). Установлено, что увеличение этих показателей сверх оптимального уровня ($HBD > 5$, $HBA > 7$, $PSA > 130 \text{ \AA}^2$) сопровождается резким ухудшением энергии связывания. Липофильность ($\log P$) также играет существенную роль: оптимальное значение для данной мишени находится в области 1,5.

8. На основании комплекса проведённых исследований может быть предложено следующее ранжирование веществ по эффективности взаимодействия с белком-мишенью, посредством водородных связей:

- 1-й ранг: кверцетин - наиболее эффективное соединение по взаимодействию с белками-мишенями, характеризующееся наилучшими энергетическими показателями и сбалансированными структурными дескрипторами;

- 2-й ранг: цефтазидим - референтное соединение со стабильными, но не максимальными показателями;

- 3-й ранг: галловая кислота - вещество со специфическим профилем, ориентированным на образование водородных связей, но уступающее по энергетическим характеристикам;

- 4-й ранг: рутин - соединение, не обладающее значимой ингибирующей активностью в исследованных условиях.

9. Сформулирован профиль «идеального ингибитора» для исследованной белковой мишени: оптимальное соединение должно характеризоваться умеренным числом доноров (3-5) и акцепторов (5-7) водородной связи, полярной поверхностью в диапазоне 100-150 Å², значением logP около 1,5 и молекулярной массой не более 350 Да.

Полученные в результате проведенного исследования данные позволяют не только провести ранжирование исследованных веществ по эффективности связывания, но и выявить структурные факторы, которые определяют степень их биологической активности. Результаты могут быть использованы в направленном поиске и оптимизации соединений с заданными свойствами.

3.8 Согласованность комплексных данных статистического анализа и результатов диско-диффузионного метода агаровых лунок

Оценка проявления аддитивных и антагонистических эффектов совместно с полученными экспериментальными данными и рассчитанными статистическими показателями позволяет отметить усиление эффекта ингибирования роста микроорганизмов в комбинации цефтазидима с кверцетином. В данном сочетании фиксируется увеличение зоны ингибирования роста *S.aureus* ATCC 29213 на 17,3 % и *P. aeruginosa* ATCC 27853 на 28,2 % при совместном применении. Данное усиление эффекта является статистически значимым ($p \leq 0,05$) и подкрепляется увеличением ΔG на 0,56 ккал/моль ($p < 0,001$) и снижением K_i в 2,6 раза, что свидетельствует о более выгодном термодинамическом связывании и возрастании сродства к мишени.

Также кверцетин имеет предпочтительные параметры по результатам QSAR-анализа: это число доноров и акцепторов водородных связей, полярная поверхность, липофильность ($\log P \approx 1,5$).

Кластерный анализ показывает специфическую ориентацию кверцетина (кластер 12, (2 в первоначальном варианте)) в активном центре, что говорит о стабильном и выгодном позиционировании.

Рутин проявляет антагонизм с цефтазидимом. В отношении *S. aureus ATCC 29213* зоны ингибирования роста отсутствуют при комбинации, то есть бактерицидная активность цефтазидима практически теряется. Это подтверждается расчётами, а именно ΔG рутина возрастает на 3,12 ккал/моль, что делает связывание с белками-мишенями менее выгодным. Фиксируется увеличение K_i в 192 раза, что говорит о резком падении сродства к мишени. Рутин не демонстрирует специфического связывания (нет предпочтительного кластера), то есть молекула не фиксируется в нужной ориентации. В PCA рутин вместе с кверцетином образует отдельный кластер, но по вкладу в ингибирование он резко отличается: QSAR - ранжирование ставит рутин на последнее место.

Для галловой кислоты характерен разнонаправленный эффект.

Так для штамма *S. aureus ATCC 29213* отмечено увеличение зоны ингибирования роста при комплексном применении с цефтазидимом на 8 % при концентрации 0,1 г/л, однако эффект отсутствует при снижении концентрации.

В случае *P. aeruginosa ATCC 27853* отмечается рост ингибирующего действия комплекса галловой кислоты с цефтазидимом на 11-84 % в диапазоне концентраций от 0,1-0,002 г/л ($p < 0,01$ и $p < 0,05$) – выраженный аддитивный эффект, причём он усиливается при уменьшении концентрации, что может указывать на нелинейную зависимость, что может указывать на особенности проницаемости мембраны *P. aeruginosa* или на участие дополнительных механизмов.

Галловая кислота имеет собственный предпочтительный кластер (кластер 8, (3 в первоначальном варианте)), то есть она способна к специфическому связыванию.

По QSAR-параметрам она уступает кверцетину, но эффективнее по вероятности связывания чем рутин, что согласуется с промежуточным/вариабельным эффектом.

MANOVA (критерий Уилкса=0,00087; $F=244,28$; $p<0,001$) показывает, что профили эффективности веществ принципиально разные – комбинации фитометаболитов с цефтазидимом нельзя считать равнозначными.

ANOVA и пост-хок-анализ (Тьюки) подтверждают значимый вклад параметров h - bond, ΔG , K_i , LE, ΔE ($p<0,001$). Особенно важен LE (ligand efficiency) - он лучше всего разделяет вещества.

PCA визуализирует чёткое разделение: первые две компоненты объясняют 67,3 % дисперсии, и видно, что цефтазидим, галловая кислота и пара кверцетин-рутин занимают разные области пространства признаков.

Ранжирование по QSAR (кверцетин > цефтазидим > галловая кислота > рутин) согласуется с наблюдаемыми биологическими эффектами и объясняет их структурными детерминантами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комбинирование цефтазидима с кверцетином демонстрирует выраженный аддитивный эффект: зона ингибирования роста возрастает у *S. aureus* ATCC 29213 на 17,3 % и у *P. aeruginosa* ATCC 27853 ($p \leq 0,05$) на 28,2 % для. Это согласуется с расчётными данными - свободная энергия образования комплекса ΔG улучшается на 0,56 ккал/моль ($p < 0,001$), а константа ингибирования K_i снижается в 2,6 раза, что отражает рост сродства к мишени. Кверцетин обладает собственным кластером ориентации (кластер 12) в активном центре и удовлетворяет QSAR-критериям ($\log P \approx 1,5$, оптимальное число доноров/акцепторов водородных связей, полярная поверхность).

Рутин, проявляет антагонизм с цефтазидимом: в отношении *S. aureus* ATCC 29213 бактерицидная активность практически полностью утрачивается. ΔG возрастает на 3,12 ккал/моль, K_i увеличивается в 192 раза - резкое падение аффинности к белку-мишени. Специфического связывания рутина не демонстрирует (отсутствует предпочтительный кластер), а по рассчитанному QSAR-ранжированию характеризуется как потенциально наименее активный.

Галловая кислота демонстрирует концентрационно-зависимый, разнонаправленный эффект. В комплексе с цефтазидимом в отношении *S. aureus* ATCC 29213 зона ингибирования роста увеличивается на 8 % (0,1 г/л) - слабый аддитивный эффект, исчезающий при снижении концентрации. Для *P. aeruginosa* ATCC 27853 рост ингибирования составляет 11-84 % (0,1-0,002 г/л, $p < 0,05$) - выраженный аддитивный эффект, усиливающийся при уменьшении концентрации, что может указывать на нелинейную зависимость, связанную с особенностями проницаемости мембраны *P. aeruginosa*. Галловая кислота имеет собственный кластер связывания (кластер 8); по QSAR-параметрам она занимает промежуточное положение между кверцетином и рутином.

Многомерный дисперсионный анализ (MANOVA: критерий Уилкса = 0,00087; $F = 244,28$; $p < 0,001$) подтверждает, что профили эффективности комбинаций принципиально различаются. ANOVA и апостериорный тест Тьюки выде-

ляют значимый вклад параметров h-bond, ΔG , K_i , LE и ΔE ($p < 0,001$), причём (LE) наиболее эффективно разделяет вещества. Итоговое QSAR-ранжирование (кверцетин > цефтазидим > галловая кислота > рутин) согласуется с наблюдаемыми биологическими эффектами и объясняет их структурными детерминантами.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что формирование межмолекулярных комплексов цефтазидима с фенольными фитометаболитами осуществляется за счёт водородных связей и электростатических сил - без образования новых ковалентных взаимодействий. Установлено, что наибольшим потенцирующим эффектом обладает кверцетин, что, вероятно, обусловлено его высокой конформационной гибкостью, мультиточечным связыванием с ключевыми остатками активных центров пенициллин-связывающего белка и β -лактамаз и термодинамической выгодностью комплексообразования.

2. Установлен высокий уровень аффинности кверцетина к РВРЗ, с низкими значениями ΔG , низкой константой ингибирования (K_i), образованием большого количества водородных связей (в т. ч. с ключевыми аминокислотными остатками Ser, Asn, Arg, Asp), и перспективными параметрами взаимодействия с β -лактамазами PC1 семейства BlaZ и OXA-10.

Показано, что галловая кислота характеризуется низким сродством к РВРЗ, низкими значениями K_i , образованием двух водородных связей с Asn, Arg, Glu и Lys, но проявляет высокую степень аффинности к β -лактамазам.

Установлена низкая аффинность рутина к РВРЗ: $\Delta G > 0$ (термодинамически невыгодное связывание), одна водородная связь в большинстве конформаций, преимущественно с Ser, Asn, Arg, Lys, высокие K_i и существенно уступает по всем параметрам кверцетину: $\Delta G = -4,53$ ккал/моль, $K_i = 478,33$ мкМ, одна водородная связь, в отношении β -лактамаз.

3. Доказаны высоко значимые различия между исследуемыми веществами (критерий Уилкса=0,00087; $F=244,28$), свидетельствующие о принципиально разных факторах их эффективности. Основным фактором эффективности кверцетина является его конформационная гибкость (5 водородных связей с РВРЗ, 2-3 с OXA-10), адаптация к различным конформациям белка-мишени и энтропийно выгодное комплексообразование; галловая кислота характеризуется компактностью и плотностью донорных центров. Три фенольные ОН-группы в малой молекуле

обеспечивают максимальный h-bond (3,08) и экстремальный LE. Особенностью рутина является его стерическая загруженность. Все пять изученных нами показателей, у него статистически существенно ниже, чем у остальных веществ: ΔG положительна (+0,55), K_i превышает 420 000 мкМ. Ранжирование по эффективности взаимодействия с белками-мишенями: кверцетин > галловая кислота > рутин.

4. Установлен выраженный аддитивный бактерицидный эффект кверцетина с цефтазидимом, зона ингибирования роста *S. aureus* ATCC 29213 возрасла на 17,3% и на 28,2 % у *P. aeruginosa* ATCC 27853, подтвержденный улучшением термодинамических показателей ΔG на 0,56 ккал/моль и снижением K_i в 2,6 раза. При этом рутин проявляет антагонизм в комбинации с цефтазидимом, зоны ингибирования *S. aureus* ATCC 29213 отсутствуют, ΔG возрастает на 3,12 ккал/моль, K_i увеличивается в 192 раза. У галловой кислоты в комплексе с цефтазидимом в отношении *S. Aureus* ATCC 29213 выявлено увеличение зоны ингибирования на 8 % (при 0,1 г/л) с последующим отсутствием эффекта при разведении. В отношении *P.aeruginosa* ATCC 27853 ингибирующее действие возрастает на 11-84 % в диапазоне 0,1-0,002 г/л, с усилением эффекта при снижении концентрации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abbas M., Saeed F., Anjum F. M. et al. Natural polyphenols: an overview // *International Journal of Food Properties*. - 2017. - T. 20, № 8. - C. 1689-1699.
2. Abdallah E., Alhudhaibi A. The WHO priority list of antibiotics-resistant bacteria: challenges and opportunities for next-generation antimicrobial development // *Frontiers in Pharmacology*. - 2026. - Vol. 16. Art. 1699987.
3. Abdel Bar F. M. Anti-biofilm and anti-quorum sensing activities of galloylquinic acid against clinical isolates of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* / F. M. Abdel Bar [et al.] // *BMC Microbiology*. - 2024. - Vol. 24. - Art. 371.
4. Abo-Qotuf E. Quercetin and rutin as a dual approach to antibacterial and anti-biofilm activity via iron chelation mechanism / E. Abo-Qotuf [et al.] // *Discover Food*. - 2024. - Vol. 2. - Art. 265.
5. Abriata L.A., Salverda M.L.M., Tomatis P. E. Sequence-function-stability relationships in proteins from datasets of functionally annotated variants: the case of TEM β -lactamases // *FEBS Letters*. - 2012. - T. 586. - C. 3330-3335.
6. Adediran S. A., Zhang Z., Nukaga M., Palzkill T., Pratt R. F. The D-methyl group in beta-lactamase evolution: evidence from the Y221G and GC1 mutants of the class C beta-lactamase of *Enterobacter cloacae* P99 // *Biochemistry*. - 2005. - T. 44. - C. 7543-7552.
7. Alam M. S., Rahman S. M. M., Lee D. U. Synthesis, biological evaluation, quantitative-SAR and docking studies of novel chalcone derivatives as antibacterial and antioxidant agents // *Chemical Papers*. - 2015. - T. 69, № 8. - C. 1118-1129.
8. Al-Bakri A. G. Novel Modified Piperacillin Inhibitors of Penicillin-Binding Protein 3 (PBP3) and Their Intermolecular Interactions // *Pakistan Journal of Biological Sciences*. - 2024. - T. 27, № 9. - C. 455-468.
9. Alfei S., Schito A. M. β -Lactam antibiotics and β -lactamase enzymes inhibitors. Part 2: Our limited resources // *Pharmaceuticals (Basel)*. - 2022. - T. 15, № 4. - C. 476.

10. AlSheikh H. M. A., Sultan I., Kumar V., Rather I. A., Al-Sheikh H., Tasleem Jan A., Haq Q. M. R. Plant-based phytochemicals as possible alternative to antibiotics in combating bacterial drug resistance // *Antibiotics*. - 2020. - T. 9, № 8. - C. 480.
11. Archana S., Abraham J. Comparative analysis of antimicrobial activity of leaf extracts from fresh green tea, commercial green tea and black tea on pathogens // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. - 2011. - T. 1, № 8. - C. 152-159.
12. Aslam M. S., Ahmad M. S., Ahmad M. A., Akhlaq M. An updated review on phytochemical and pharmacological properties of *Piper sarmentosum* // *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. - 2017. - T. 11, № 4. - C. 345-356.
13. Babii C., Bahrin L. G., Neagu A.-N. et al. Antibacterial activity and proposed action mechanism of a new class of synthetic tricyclic flavonoids // *Journal of Applied Microbiology*. - 2016. - T. 120, № 3. - C. 630-637.
14. Balaban N. Q., Helaine S., Lewis K., et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence // *Nature Reviews Microbiology*. - 2019. - Vol. 17, № 7. - P. 441-448. - DOI: 10.1038/s41579-019-0196-3.
15. Baran A., Kwiatkowska A., Potocki L. Antibiotics and bacterial resistance - a short story of an endless arms race // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2023. - T. 24, № 6. - C. 5777.
16. Barreteau H., Blanot D., Boniface A., Gobec S., Kovač A., Sova M. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis // *FEMS Microbiology Reviews*. - 2008. - Vol. 32, № 2. - P. 168-207.
17. Beale J. M. Jr. Antibacterial antibiotics // *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* / ed. by J. M. Beale Jr, J. Block. - 12th ed. - Baltimore, MD: Lippincott Williams and Wilkins, 2011. - P. 258-329.
18. Biharee A., Sharma A., Kumar A., Jaitak V. Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance // *Fitoterapia*. - 2020. - T. 146. - C. 104720.
19. Blanco-Martín T., López-Hernández I., Aracil B., González-Pinto L., Aja-Macaya P., Alonso-García I., Rodríguez-Pallares S., Sánchez-Peña L., Outeda-García M., Pérez-Vázquez M., Vázquez-Ucha J. C., Beceiro A., Pascual Á., Bou G., López-

Cerero L., Oteo-Iglesias J., Arca-Suárez J; GEMARA-SEIMC/CIBERINFEC Study Group on the activity and resistance mechanisms to new β -lactams and β -lactamase inhibitors (PROTECT). Assessment of the activity and mechanisms of resistance to cefiderocol and combinations of β -lactams and the novel β -lactamase inhibitors avibactam, taniborbactam, zidebactam, nacubactam, xeruborbactam, and ANT3310 in emerging double-carbapenemase-producing Enterobacterales // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2024. - T. 68, № 11. - C. e0092424.

20. Bonomo R. A. β -Lactamases: A focus on current challenges // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. - 2017. - T. 7, № 1. - C. a025239.

21. Borges A. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria / A. Borges, C. Ferreira, M. J. Saavedra, M. Simões // *Microbial Drug Resistance*. — 2013. — Vol. 19, № 4. — P. 256-265

22. Bouhss A., Trunkfield A. E., Bugg T. D. H., Mengin-Lecreulx D. The biosynthesis of peptidoglycan lipid linked intermediates // *FEMS Microbiology Reviews*. - 2007. - T. 32. - C. 208-233.

23. Breukink E., de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics // *Nature Reviews Drug Discovery*. - 2006. - T. 5. - C. 321-332.

24. Caccamo P. D., Brun Y. V. The molecular basis of noncanonical bacterial morphology // *Trends in Microbiology*. - 2018. - Vol. 26, № 3. - P. 191-208.

25. Candel F. J., González Del Castillo J., Julián Jiménez A., Matesanz M. Ceftolozane-tazobactam in nosocomial pneumonia // *Revista Española de Quimioterapia*. - 2022. - Vol. 35, Suppl. 1. - P. 35-39.

26. Caprile K.A. The cephalosporin antimicrobial agents: a comprehensive review // *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. - 1988. - T.11. - C.1-32.

27. Cardoso J. C., Oliveira M. E. B. d., Cardoso F. d. C. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants // *Horticultura Brasileira*. - 2019. - T. 37, № 2. - C. 124-132.

28. Castro-Pérez J., Gutiérrez-Ríos L., García-Alvarez B. Ceftazidime: a review of its pharmacology, clinical applications, and emerging challenges // *Frontiers in Microbiology*. - 2025. - Vol. 16. - Art. 1457890.

29. Caveney N. A., Li F. K. K., Strynadka N. C. J. Enzyme structures of the bacterial peptidoglycan and wall teichoic acid biogenesis pathways // *Current Opinion in Structural Biology*. - 2018. - Vol. 53. - P. 45-58.
30. Chen C. C., Rahil J., Pratt R. F., Herzberg O. Structure of a phosphonate-inhibited β -lactamase: an analog of the tetrahedral transition state/intermediate of β -lactam hydrolysis // *Journal of Molecular Biology*. - 1993. - Vol. 234, № 1. - P. 165-178.
31. Chen C. Sinapic acid and its derivatives as medicine in oxidative stress-induced diseases and aging // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. - 2016. - C. 3571614-3571610.
32. Cho H., Uehara T., Bernhardt T.G. Bacterial cell wall assembly: still an attractive antibacterial target? // *Trends in Microbiology*. - 2014. - Vol. 22, № 3. - P. 163-172.
33. Chu Q., Bao B., Wu W. Mechanism of interaction between phenolic compounds and proteins based on non-covalent and covalent interactions // *Medical Research*. - 2018. - T. 2. - C. 180014.
34. Cutillo F., D'Abrosca B., Della Greca M., Fiorentino A., Zarrelli A. Terpenoids and phenol derivatives from *Malva silvestris* // *Phytochemistry*. - 2006. - Vol. 67, No. 5. - P. 481-485.
35. Dabhi M., Patel R., Shah V., Soni R., Saraf M., Rawal R., Goswami D. Penicillin-binding proteins: the master builders and breakers of bacterial cell walls and its interaction with β -lactam antibiotics // *Journal of Proteins and Proteomics*. - 2024. - Vol. 15, no. 2. - P. 215-232.
36. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents // *Current Opinion in Biotechnology*. - 2012. - Vol. 23, no. 2. - P. 174-181.
37. Dancer S. J. The problem with cephalosporins // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2001. - Vol. 48, no. 4. - P. 463-478.
38. De Rossi L., Rocchetti G., Lucini L., Rebecchi A. Antimicrobial Potential of Polyphenols: Mechanisms of Action and Microbial Responses - A Narrative Review // *Antioxidants*. - 2025. - Vol. 14, no. 2. - Art. 200.

39. Dive G., Dehareng D. Serine peptidase catalytic machinery: cooperative one-step mechanism // *International Journal of Quantum Chemistry*. - 1999. - Vol. 73, no. 2. - P. 161-174.
40. Drawz S. M., Bonomo R. A. Three decades of β -lactamase inhibitors // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2010. - Vol. 23, no. 1. - P. 160-201
41. Edziri H., Mastouri M., Mahjoub M. A., Mighri Z., Mahjoub A., Verschaeve L. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of two flavonoids from *Retama raetam* flowers // *Molecules*. - 2012. - Vol. 17, no. 6. - P. 7284-7293.
42. Egorov A. M., Ulyashova M. M., Rubtsova M. Y. Inhibitors of β -lactamases. New life of β -lactam antibiotics // *Biochemistry (Moscow)*. - 2020. - Vol. 85, no. 11. - P. 1292-1309.
43. El Ghachi M., Mesnage S., Ure R., Mengin-Lecreulx D., Bouhss A. The bac-toprenol phosphatase activity of the *Escherichia coli* BacA protein plays a role in recycling of the lipid carrier in the bacterial cell wall biogenesis pathway // *Journal of Biological Chemistry*. - 2005. - Vol. 280, no. 39. - P. 34400-34407.
44. Esnaashari F. Antivirulence activities of Rutin-loaded chitosan nanoparticles against pathogenic *Staphylococcus aureus* / F. Esnaashari, H. Zahmatkesh [et al.] // *BMC Microbiology*. - 2024. - Vol. 24. - Art. 272.
45. Faraci W. S., Pratt R. F. Interactions of cephalosporins with the *Streptomyces* R61 DD-transpeptidase/carboxypeptidase. Influence of the 3'-substituent // *Biochemical Journal*. - 1986. - Vol. 238, no. 2. - P. 309-312.
46. Farhadi F., Khameneh B., Iranshahi M., Iranshahy M. Antibacterial activity of flavonoids and their structure-activity relationship: an update review // *Phytotherapy Research*. - 2019. - Vol. 33, no. 1. - P. 13-40.
47. Feng Y., Jin C., Lv S., Zhang H., Ren F., Wang J. Molecular Mechanisms and Applications of Polyphenol-Protein Complexes with Antioxidant Properties: A Review // *Antioxidants*. - 2023. - Vol. 12, N 8. - 1577.
48. Fröhlich C., Chen J. Z., Gholipour S., Erdogan A. N., Tokuriki N. Evolution of β -lactamases and enzyme promiscuity. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2021. Vol. 34. gzab013.

49. Fröhlich C., Sørum V., Tokuriki N., Johnsen P. J., Samuelsen Ø. Evolution of β -lactamase-mediated cefiderocol resistance // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2022. - Vol. 77, no. 9. - P. 2429-2436.
50. Ganesan K., Xu B. A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans // *Nutrients*. - 2017. - Vol. 9, No. 5. - Art. 455.
51. Garde S., Chodiseti P. K., Reddy M. P. Peptidoglycan: Structure, synthesis, and regulation // *EcoSal Plus*. - 2021. - Vol. 9, no. 2. - Art. eESP-0010-2020.
52. Garg B., Maliye C. Adolescent health and adolescent health programs in India // *Journal of Mahatma Gandhi Institute of Medical Sciences*. - 2017. - Vol. 22, no. 2. - P. 78-83.
53. Glen K. A., Lamont I. L. Penicillin-binding protein 3 sequence variations reduce susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to β -lactams but inhibit cell division // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2024. - Vol. 79, no. 9. - P. 2170-2178.
54. Global antibiotic resistance surveillance report 2025: WHO Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) / World Health Organization. - Geneva: World Health Organization, 2025.
55. Gobin A. A combination of the natural molecules gallic acid and carvacrol eradicates *P. aeruginosa* and *S. aureus* mature biofilms / A. Gobin [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. — 2022.
56. Goffin C., Ghuysen J. M. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. - 1998. - Vol. 62, no. 4. - P. 1079-1093.
57. Gopal J., Muthu M., Paul D., Kim D. H., Chun S. Bactericidal activity of green tea extracts: the importance of catechin containing nano particles // *Scientific Reports*. - 2016. - Vol. 6. - Art. 19710.
58. Gopinath V. Antibacterial and biofilm inhibitory effects of rutin nanocrystals / V. Gopinath [et al.] // *Biointerface Research in Applied Chemistry*. - 2022. - Vol. 13, № 2. - Art. 132.

59. Górniak I., Bartoszewski R., Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids // *Phytochemistry Reviews*. - 2019. - Vol. 18, no. 2. - P. 241-272.
60. Günal-Köroğlu D., Lorenzo J. M., Capanoglu E. Plant-Based Protein-Phenolic Interactions: Effect on Different Matrices and In Vitro Gastrointestinal Digestion // *Food Research International*. - 2023. - Vol. 173, Pt. 1. - Art. 113269.
61. Guzman J. D. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity // *Molecules*. - 2014. - Vol. 19, no. 12. - P. 19292-19349.
62. Han S., Zaniewski R. P., Marr E. S., Lacey B. M., Tomaras A. P., Evdokimov A., Miller J. R., Shanmugasundaram V. Structural basis for effectiveness of siderophore-conjugated monocarbams against clinically relevant strains of *Pseudomonas aeruginosa* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2010. - Vol. 107, no. 51. - P. 22002-22007.
63. Hanci H., Igan H. Antimicrobial synergistic effects of apigenin, (-)-epigallocatechin-3-gallate, myricetin and luteolin in combination with some antibiotics // *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. - 2023. - Vol. 30, No. 1. - P. 61-64.
64. He W., Xu H., Lu Y., Zhang T., Li S., Lin X. Function, Digestibility and Allergenicity Assessment of Ovalbumin-EGCG Conjugates // *Journal of Functional Foods*. - 2019. - Vol. 61. - Art. 103490.
65. Hemaiswarya S., Doble M. Synergistic Interaction of Phenylpropanoids with Antibiotics against Bacteria // *Journal of Medical Microbiology*. - 2010. - Vol. 59, No. 12. - P. 1469-1476.
66. Hidalgo-Tenorio C., Bou G., Oliver A., Rodríguez-Aguirregabiria M., Salavert M., Martínez-Martínez L. The Challenge of Treating Infections Caused by Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria: A Narrative Review // *Drugs*. - 2024. - Vol. 84, No. 12. - P. 1519-1539.
67. Holler J. G., Christensen S. B., Slotved H.-C. et al. Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from *Persea lingue* Nees // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2012. - Vol. 67, No. 5. - P. 1138-1144.

68. Hunashal Y., Senthil Kumar G., Choy M. S., D'Andréa É. D., Da Silva Santiago A., Schoenle M. V., Desbonnet C., Arthur M., Rice L. B., Page R., Peti W. Molecular basis of β -lactam antibiotic resistance of ESKAPE bacterium *E. faecium* Penicillin Binding Protein PBP5 // *Nature Communications*. - 2023. - Vol. 14. - Art. 4268.
69. Jiamboonsri P., Eurtivong C., Wanwong S. Assessing the Potential of Gallic Acid and Methyl Gallate to Enhance the Efficacy of β -Lactam Antibiotics against MRSA by Targeting β -Lactamase: In Silico and In Vitro Studies // *Antibiotics (Basel)*. - 2023. - Vol. 12, no. 11. - P. 1622.
70. Li Y. Gallic acid exerts antibiofilm activity by inhibiting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* adhesion / Y. Li [et al.] // *ResearchGate*. — 2024.
71. Keyvani-Ghamsari S., Rahimi M., Khorsandi K. An Update on the Potential Mechanism of Gallic Acid as an Antibacterial and Anticancer Agent // *Food Science & Nutrition*. - 2023. - Vol. 11, no. 10. - P. 5856-5872.
72. Khan T., Sankhe K., Suvarna V., Sherje A., Patel K., Dravyakar B. DNA gyrase inhibitors: progress and synthesis of potent compounds as antibacterial agents // *Bio-medicine & Pharmacotherapy*. - 2018. - Vol. 103, No. - P. 923-938.
73. Kim D., Kim S., Kwon Y., Kim Y., Park H., Kwak K., Lee H., Lee J. H., Jang K. M., Kim D., Lee S. H., Kang L. W. Structural insights for β -lactam antibiotics // *Biomolecules & Therapeutics*. - 2023. - Vol. 31, No. 2. - P. 141-147.
74. Kishida H., Unzai S., Roper D. I., Lloyd A., Park S.-Y., Tame J. R. H. Crystal structure of penicillin binding protein 4 (dacB) from *Escherichia coli*, both in the native form and covalently linked to various antibiotics // *Biochemistry*. - 2006. - Vol. 45, No. 3. - P. 783-792.
75. Klein E. Y., Van Boeckel T. P., Martinez E. M., Pant S., Gandra S., Levin S. A., Goossens H., Laxminarayan R. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2018. - Vol. 115, No. 15. - P. E3463-E3470.
76. Koudokpon H., Armstrong N., Dougnon T. V., Fah L., Hounsa E., Bankolé H. S., Loko F., Chabrière E., Rolain J. M. Antibacterial activity of chalcone and dihy-

drochalcone compounds from *Uvaria chamae* roots against multidrug-resistant bacteria // *BioMed Research International*. - 2018. - Vol. 2018. - P. 1453173.

77. Kuzin A. P., Liu H., Kelly J. A., Knox J. R. Binding of cephalothin and cefotaxime to D-ala-D-ala-peptidase reveals a functional basis of a natural mutation in a low-affinity penicillin-binding protein and in extended-spectrum beta-lactamases // *Biochemistry*. - 1995. - Vol. 34, No. 29. - P. 9532-9540.

78. Lagacé-Wiens P. R., Walkty A., Karlowsky J. A. Ceftazidime-avibactam: an evidence-based review of its pharmacology and potential use in the treatment of Gram-negative bacterial infections // *Core Evidence*. - 2014. - Vol. 9. - P. 13-25.

79. Le Terrier C., Nordmann P., Freret C., Seigneur M., Poirel L. Impact of acquired broad-spectrum β -lactamases on susceptibility to novel combinations made of β -lactams (aztreonam, cefepime, meropenem, and imipenem) and novel β -lactamase inhibitors in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2023. - Vol. 67, No. 7. - P. e0033923.

80. Ledger E. V. K., Massey R. C. PBP4 is required for serum-induced cell wall thickening and antibiotic tolerance in *Staphylococcus aureus* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2024. - Vol. 68, No. 11. - P. e00961-24.

81. Lee J., Feldman A. R., Delmas B., Paetzel M. Crystal structure of the VP4 protease from infectious pancreatic necrosis virus reveals the acyl-enzyme complex for an intermolecular self-cleavage reaction // *Journal of Biological Chemistry*. - 2007. - Vol. 282. - P. 24928-24937.

82. Lee Y., Bhatt P., Bhatt D. et al. Molecular resistance mechanisms to newly approved antibiotics (2017-2025) in WHO priority pathogens // *Frontiers in Microbiology*. - 2025. - Vol. 16. - Art. 1719798.

83. Lešnik S., Jukić M., Bren U. Unveiling polyphenol-protein interactions: a comprehensive computational analysis // *Journal of Cheminformatics*. - 2025. - Vol. 17. - P. 50.

84. Liga S., Paul C., Péter F. Flavonoids: overview of biosynthesis, biological activity, and current extraction techniques // *Plants*. - 2023. - Vol. 12, No. 14. - P. 2732.

85. Lima V. N., Oliveira-Tintino C. D. M., Santos E. S., Morais L. P., Tintino S. R., Freitas T. S., Geraldo Y. S., Pereira R. L. S., Cruz R. P., Menezes I. R. A., Coutinho H. D. M. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol // *Microbial Pathogenesis*. - 2016. - Vol. 99. - P. 56-61.
86. Lim D., Strynadka N. C. Structural basis for the β -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Nature Structural Biology*. - 2002. - Vol. 9. - P. 870-876.
87. Lin D., Xiao M., Zhao J. et al. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes // *Molecules*. - 2016. - Vol. 21, No. 10. - P. 1374.
88. Lin X., Kück U. Cephalosporins as key lead generation beta-lactam antibiotics // *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 2022. - Vol. 106, No. 24. - P. 8007-8020.
89. Lou Z., Wang H., Rao S., Sun J., Ma C., Li J. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms // *Food Control*. - 2012. - T. 25, № 2. - C. 550-554.
90. Lovering A. L. et al. Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis // *Science*. - 2007. - Vol. 315. - P. 1440-1443.
91. Madhane A. Comparative Analysis of Cephalosporins Pharmacokinetics and Pharmacodynamics // *Int. J. Pharm. Sci*. - 2025. - Vol. 3, No. 5. - P. 2494-2502.
92. Mahmood H. Y., Jamshidi S., Sutton J. M., Rahman K. M. Current advances in developing inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps // *Current Medicinal Chemistry*. - 2016. - Vol. 23, No. 10. - P. 1062-1081.
93. Malabanan M. M., Amyes T. L., Richard J. P. A role for flexible loops in enzyme catalysis // *Current Opinion in Structural Biology*. - 2010. - T. 20. - C. 702-710.
94. Malik N., Ahmed S. Antimicrobial activity of *Carica papaya*, *Piper nigrum* и *Datura stramonium* plants on drug-resistant pathogens isolated from clinical specimens // *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry*. - 2016. - Vol. 2, No. 6. - P. 56-61.
95. Marino A., Campanella E., Stracquadanio S., Calvo M., Migliorisi G., Nicolosi A., Cosentino F., Marletta S., Spampinato S., Prestifilippo P., Stefani S., Caco-

pardo B., Nunnari G. Ceftazidime/Avibactam and Meropenem/Vaborbactam for the Management of Enterobacterales Infections: A Narrative Review, Clinical Considerations, and Expert Opinion // *Antibiotics*. - 2023. - Vol. 12, No. 10. - P. 1521.

96. Massova I., Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 1998. - Vol. 42. - P. 1-17.

97. Masumi M., Noormohammadi F., Kianisaba F. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: docking-based virtual screening and molecular dynamics simulations to identify potential penicillin-binding protein 2a inhibitors from natural flavonoids // *International Journal of Microbiology*. - 2022. - Vol. 2022. - Art. 9130700.

98. Matos M. J., Vazquez-Rodriguez S., Uriarte E., Santana L. Potential pharmacological uses of chalcones: a patent review (from June 2011-2014) // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. - 2015. - Vol. 25, No. 3. - P. 351-366.

99. Mazzantini D., Massimino M., Calvigioni M. et al. Anti-staphylococcal activity of a polyphenol-rich citrus extract: synergy with β -lactams and low proficiency to induce resistance // *Frontiers in Microbiology*. - 2024. - Vol. 15. - P. 1415400.

100. Meeske A. J., Riley E. P., Robins W. P., Uehara T., Mekalanos J. J., Kahne D., Walker S., Kruse A. C., Bernhardt T. G., Rudner D. Z. SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases // *Nature*. - 2016. - Vol. 537. - P. 634-638.

101. Meroueh S. O., Bencze K. Z., Hesek D., Lee M., Fisher J. F., Stemmler T. L., Mobashery S. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. - 2006. - Vol. 103. - P. 4404-4409.

102. Moyo P., Albert I. O., Hlungwani N., Sibanda T., Lumu P., Khorommbi N. K., Kaur G., Calvopina Tapia K., Siegwart G., Buabeng N. K., Danquah C. A., McGaw L. J., Cosa S., Schofield C. J., Maharaj V. J. β -Lactam antibiotics and β -lactamases: historical perspectives and a review of β -lactamase inhibitors derived from natural products // *Natural Product Reports*. - 2026.

103. Naghavi M. et al. (GRAM Project). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990-2021: a systematic analysis with forecasts to 2050 // *The Lancet*. - 2024. - Vol. 404, No. 10459. - P. 1199-1226.
104. Ndendoung S., Tamokou J. D. D., Havyarimana L. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum* // *BMC Research Notes*. - 2012. - Vol. 5. - P. 158.
105. Neu H. C. Beta-lactamase stability of cefoxitin in comparison with other beta-lactam compounds // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. - 1983. - Vol. 1. - P. 313-316.
106. Nguyen, T. H. Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle / T. H. Nguyen, S. Bhattacharya // *PMC*. - 2022.
107. Nicola G., Peddi S., Stefanova M., Nicholas R. A., Gutheil W. G., Davies C. Crystal structure of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5 bound to a tripeptide boronic acid inhibitor: a role for Ser-110 in deacylation // *Biochemistry*. - 2005. - Vol. 44. - P. 8207-8217.
108. Othman L., Sleiman A., Abdel-Massih R. M. Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in Middle Eastern plants // *Frontiers in Microbiology*. - 2019. - Vol. 10. - Art. 911.
109. Pagare S., Bhatia M., Tripathi N., Pagare S., Bansal Y. K. Secondary metabolites of plants and their role: overview // *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. - 2015. - Vol. 9, No. 3. - P. 293-304.
110. Pandey D., Singhal N., Kumar M. β -Lactamase prediction and classification tool β -LacFamPred: an online tool for prediction and classification of β -lactamase class, subclass, and family // *Frontiers in Microbiology*. - 2023. - Vol. 13. - P. 1039687.
111. Pandey N., Cascella M. Beta-lactam antibiotics // *StatPearls (Internet)*. - Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.
112. Patel K., Tyagi C., Goyal S. et al. Identification of chebulinic acid as a potent natural inhibitor of *M. tuberculosis* DNA gyrase and molecular insights into its binding mode of action // *Computational Biology and Chemistry*. - 2015. - Vol. 59. - P. 37-47.

113. Pereira S. F., Henriques A. O., Pinho M. G., De Lencastre H., Tomasz A. Role of PBP1 in cell division of *Staphylococcus aureus* // *Journal of Bacteriology*. - 2007. - Vol. 189. - P. 3525-3531.

114. Pott D. M., Osorio S., Vallarino J. G. From central to specialized metabolism: an overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit // *Frontiers in Plant Science*. - 2019. - Vol. 10. - P. 835.

115. Powell A. J., Tomberg J., Deacon A. M., Nicholas R. A., Davies C. Crystal structures of penicillin-binding protein 2 from penicillin-susceptible and -resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an unexpectedly subtle mechanism for antibiotic resistance // *Journal of Biological Chemistry*. - 2009. - Vol. 284. - P. 1202-1212.

116. Powers R. A., Caselli E., Focia P. J., Prati F., Shoichet B. K. Structures of cef-tazidime and its transition-state analogue in complex with AmpC β -lactamase: implications for resistance mutations and inhibitor design // *Biochemistry*. - 2001. - Vol. 40. - P. 9207-9214.

117. Prakash O., Singh R., Singh N. et al. Exploring the potentials of quercetin and kaempferol combinations along with regular antibiotics for the effective management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) // *Research & Reviews: A Journal of Microbiology & Virology*. - 2018. - Vol. 8, No. 3. - P. 6-9.

118. Prasad Y., Atmakuri L. R., Rambabu R. Synthesis and antimicrobial activity of some chalcone derivatives // *Journal of Chemistry*. - 2008. - Vol. 5. - P. 6.

119. Quercetin: Chemical Properties, Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications / IntechOpen. - 2026.

120. Qu S., Dai C., Shen Z. et al. Mechanism of synergy between tetracycline and quercetin against antibiotic-resistant *Escherichia coli* // *Frontiers in Microbiology*. - 2019. - Vol. 10. - P. 2536.

121. Rees-Cleland T, et al. (ESGARS-ESCMID/ISARPAE Group). *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial susceptibility profiles, resistance mechanisms and international clonal lineages: 2024 update // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2024

122. Ruiz N. et al. Identification of a protein complex that assembles the peptidoglycan layer of the bacterial cell wall // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. - 2010. - Vol. 107. - P. 14851-14856.

123. Ruwizhi N., Aderibigbe B. A. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2020. - Vol. 21, No. 16. - P. 5712.

124. Sacco M., Hammond L., Noor R. et al. Staphylococcus aureus FtsZ and PBP4 bind to the conformationally dynamic N-terminal domain of GpsB // *eLife*. - 2024. - Vol. 13. - Art. e85579.

125. Sainsbury S., Bird L., Rao V., Shepherd S. M., Stuart D. I., Hunter W. N., Owens R. J., Ren J. Crystal structures of penicillin-binding protein 3 from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of native and antibiotic-bound forms // *Journal of Molecular Biology*. - 2011. - Vol. 405, No. 1. - P. 173-184.

126. Sariyer E., Saral A. Evaluation of quercetin as a potential β -lactamase CTX-M-15 inhibitor via the molecular docking, dynamics simulations, and MMGBSA // *Turkish Journal of Chemistry*. - 2021. - Vol. 45, No. 4. - P. 1045-1056.

127. Sati H., Carrara E., Savoldi A. et al. The WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: a prioritisation study to guide research, development, and public health strategies against antimicrobial resistance // *The Lancet Infectious Diseases*. - 2025. - Vol. 25, No. 9. - P. 1033-1043.

128. Sauvage E., Duez C., Herman R. et al. Crystal structure of the *Bacillus subtilis* penicillin-binding protein 4a, and its complex with a peptidoglycan mimetic peptide // *Journal of Molecular Biology*. - 2007. - Vol. 371. - P. 528-539.

129. Sauvage E., Kerff F., Terrak M. et al. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis // *FEMS Microbiology Reviews*. - 2008. - Vol. 32, No. 2. - P. 234-258.

130. Sawa T., Kooguchi K., Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance // *Journal of Intensive Care*. - 2020. - Vol. 8. - Art. 13.

131. Shaevitz J. W. Microbiology: peeling back the layers of bacterial envelope mechanics // *Current Biology*. - 2018. - Vol. 28. - P. R1210-R1211.
132. Sham L. T., Leaver M., Bernhardt T. G. et al. Bacterial cell wall: MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis // *Science*. - 2014. - Vol. 345. - P. 226-229.
133. Shao J., Zhang M., Wang T. et al. The roles of CDR1, CDR2, and MDR1 in kaempferol-induced suppression with fluconazole-resistant *Candida albicans* // *Pharmaceutical Biology*. - 2016. - Vol. 54, No. 6. - P. 984-992.
134. Shields R. K., Abbo L. M., Ackley R. et al. Effectiveness of ceftazidime-avibactam versus ceftolozane-tazobactam for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in the USA (CACTUS): a multicentre, retrospective, observational study // *The Lancet Infectious Diseases*. - 2025. - Vol. 25. - P. 574-584.
135. Silva D. M., Costa P. A. D., Ribon A. O. B. et al. Plant extracts display synergism with different classes of antibiotics // *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. - 2019. - Vol. 91, No. 2. - Art. e20180117.
136. Silva E., Teixeira J. A., Pereira M. O. et al. Evolving biofilm inhibition and eradication in clinical settings through plant-based antibiofilm agents // *Phytomedicine*. - 2023. - Vol. 119. - Art. 154973.
137. Silvaggi N. R., Anderson J. W., Brinsmade S. R. et al. The crystal structure of phosphonate-inhibited D-Ala-D-Ala peptidase reveals an analogue of a tetrahedral transition state // *Biochemistry*. - 2003. - Vol. 42, No. 5. - P. 1199-1208.
138. Sinha S. K., Prasad S. K., Islam M. A. et al. Identification of bioactive compounds from *Glycyrrhiza glabra* as possible inhibitor of SARS-CoV-2 spike glycoprotein and non-structural protein-15: a pharmacoinformatics study // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. - 2021. - Vol. 39, No. 13. - P. 4686-4700.
139. Siri Wong S., Teethaisong Y., Thumanu K. et al. The synergy and mode of action of quercetin plus amoxicillin against amoxicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* // *BMC Pharmacology & Toxicology*. - 2016. - Vol. 17, No. 1. - P. 39-44.

140. Smith H. G., Basak S., Aniebok V. et al. Structural basis of *Pseudomonas aeruginosa* penicillin binding protein 3 inhibition by the siderophore-antibiotic cefiderocol // *Chemical Science*. - 2024. - Vol. 15, No. 41. - P. 16928-16937.
141. Stec B., Holtz K. M., Wojciechowski C. L. et al. Structure of the wild-type TEM-1 β -lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme // *Acta Crystallographica Section D*. - 2005. - Vol. 61, No. 9. - P. 1072-1079.
142. Sudharsan R., Ahamed Hussain S., Thawfeeq Ahmad. A review on the use of third-generation cephalosporins on Gram-positive and Gram-negative bacteria based on its spectrum of activity // *Recent Trends in Pharmaceutical Sciences and Research*. - 2024. - Vol. 6, No. 1. - P. 1-7.
143. Sui X., Sun H., Qi B. et al. Functional and conformational changes to soy proteins accompanying anthocyanins: focus on covalent and non-covalent interactions // *Food Chemistry*. - 2018. - Vol. 245. - P. 871-878.
144. Tooke C. L., Hinchliffe P., Bragginton E. C. et al. β -Lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st century // *Journal of Molecular Biology*. - 2019. - Vol. 431, No. 18. - P. 3472-3500.
145. Trivedi R. R., Crooks J. A., Auer G. K. et al. Mechanical genomic studies reveal the role of D-alanine metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* cell stiffness // *mBio*. - 2018. - Vol. 9, No. 5. - Art. e01340-18.
146. Turner J., Muraoka A., Bedenbaugh M. et al. The chemical relationship among β -lactam antibiotics and potential impacts on reactivity and decomposition // *Frontiers in Microbiology*. - 2022. - Vol. 13. - Art. 807955.
147. Typas A., Banzhaf M., Michalska J., Sobolik-Szelc M., Linington R. G., Gavin R. H., Reusch U., Wöhrle N. M., Ohlsen K., Vollmer W. Regulation of peptidoglycan synthesis by outer-membrane proteins // *Cell*. - 2010. - Vol. 143, No. 7. - P. 1097-1109.
148. Typas A., Banzhaf M., Gross C. A., Vollmer W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology // *Nature Reviews Microbiology*. - 2011. - Vol. 10, No. 2. - P. 123-136.

149. Uehara T., Sugimoto R., Masaki Y., Matsuoka M. MurG transfers the MurNAc-pentapeptide to the GlcNAc moiety of the lipid intermediate // *Journal of Bacteriology*. - 2005. - Vol. 187, No. 20. - P. 7024-7029.
150. van Heijenoort J. Recent insights into peptidoglycan biosynthesis // *Current Opinion in Microbiology*. - 2011. - Vol. 14, No. 2. - P. 206-213.
151. Venuti F., Romani L., De Luca M. et al. Novel β -lactam antibiotics for the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections in children: a narrative review // *Microorganisms*. - 2023. - Vol. 11, No. 7. - Art. 1798.
152. Vermassen A., Leroy S., Talon R. et al. Cell wall hydrolases in bacteria: insight on the diversity of cell wall amidases, glycosidases and peptidases toward peptidoglycan // *Frontiers in Microbiology*. - 2019. - Vol. 10. - Art. 331.
153. Vipin C., Saptami K., Fida F., Mujeeburahiman M., Rao S.S., Athmika A., Arun A.B., Rekha P.D. Potential synergistic activity of quercetin with antibiotics against multidrug-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*. 2020. Vol. 15, No. 11. e0241304.
154. Vollmer W., Seligman S. J. Architecture of the major component of the bacterial cell wall: peptidoglycan // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. - 2010. - Vol. 2. - Art. a000388.
155. Wang Y., Sholeh M., Yang L., Shakourzadeh M. Z., Beig M., Azizian K. Global trends of ceftazidime-avibactam resistance in gram-negative bacteria: systematic review and meta-analysis // *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. - 2025. - Vol. 14, no. 1. - Art. 10.
156. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. — Geneva: World Health Organization, 2024. — ISBN 978-92-4-009346-1.
157. Wong F., Amir A. Mechanics and dynamics of bacterial cell lysis // *Biophysical Journal*. - 2019. - Vol. 116, no. 12. - P. 2378-2389.

158. Wyke A. W., Ward J. B., Hayes M. V., Curtis N. A. C. A role in vivo for penicillin-binding protein-4 of *Staphylococcus aureus* // *European Journal of Biochemistry*. - 1981. - Vol. 119, No. 2. - P. 389-393.
159. Xiao Y., Ahmad T., Belwal T., Aadil R. M., Siddique M., Pang L., Xu Y. A review on protein-based nanocarriers for polyphenols: interaction and stabilization mechanisms // *Food Innovation and Advances*. - 2023. - Vol. 2, No. 3. - P. 193-202.
160. Xue H., Feng J., Tang Y., Wang X., Tang J., Cai X., Zhong H. Research progress on the interaction of the polyphenol-protein-polysaccharide ternary systems // *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. - 2024. - Vol. 11. - Art. 95.
161. Yang W., Fan S., Luo J., Zhou Y., Dai X., Huang J., Wang L., Wang X. Natural products as potentiators of β -lactam antibiotics: a review of mechanisms, advances, and future directions // *Antioxidants (Basel)*. - 2026. - Vol. 15, No. 2. - Art. 154.
162. Yılmaz H., Gultekin Subasi B., Celebioglu H. U., Ozdal T., Capanoglu E. Chemistry of protein-phenolic interactions toward the microbiota and microbial infections // *Frontiers in Nutrition*. - 2022. - Vol. 9. - Art. 914118.
163. Yuheng Y., Zhang T. Antimicrobial activities of tea polyphenol on phytopathogens: a review // *Molecules*. - 2019. - Vol. 24, No. 4. - Art. 816.
164. Zapun A., Contreras-Martel C., Vernet T. Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance // *FEMS Microbiology Reviews*. - 2008. - Vol. 32, No. 2. - P. 361-385.
165. Zdarska V., Kolar M., Mlynarcik P. Occurrence of beta-lactamases in bacteria // *Infection, Genetics and Evolution*. - 2024. - Vol. 122. - Art. 105610.
166. Zhang F., Zhai T., Haider S., Liu Y., Huang Z. J. Synergistic effect of chlorogenic acid and caffeic acid with fosfomycin on growth inhibition of a resistant *Listeria monocytogenes* strain // *ACS Omega*. - 2020. - Vol. 5, No. 13. - P. 7537-7544.
167. Zhang K., Huang J., Wang D., Wan X., Wang Y. Covalent polyphenols-proteins interactions in food processing: formation mechanisms, quantification methods, bioactive effects, and applications // *Frontiers in Nutrition*. - 2024. - Vol. 11. - Art. 1371401.
168. Zhang Q., Cheng Z., Chen R., Wang Y., Miao S., Li Z. et al. Covalent and non-covalent interactions of cyanidin-3-O-glucoside with milk proteins: revealed mod-

ifications in protein conformational structures, digestibility, and allergenic characteristics // *Food & Function*. - 2021. - Vol. 12, No. 21. - P. 10107-10120.

169. Zhang Q., Cheng Z., Wang Y., Fu L. Dietary protein-phenolic interactions: characterization, biochemical-physiological consequences, and potential food applications // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. - 2021. - Vol. 61, No. 21. - P. 3589-3615.

170. Грацианская А. Н., Теплова Н. В., Белоусова Л. Б. Цефалоспорины: от цефазолина до цефидерокола // *Пациентоориентированная медицина и фармация*. - 2025. - Т. 3, № 4. - С. 11-18.

171. ГОСТ Р ИСО 20776-1-2022. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам.

172. Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар: ОФС.1.2.4.0010.18: утв. приказом Минздрава России от 31.10.2018 № 749 // *Государственная фармакопея Российской Федерации*. - XIV изд. - Москва, 2018.

173. Патент № 2839893 С1 Российская Федерация, МПК А61К 36/288, А61К 31/05, А61Р 31/04. Способ повышения ингибирующей активности цефтазидима комплексом фенольных соединений: заявл. 01.10.2024; опубл. 13.05.2025 / Плотникова Ю. А., Барышева Е. С., Осипова Е. А. (и др.); заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Оренбургский государственный университет». — EDN CZVHME.

174. Плотникова Ю. А., Барышева Е. С., Баранова О. В. и др. Биохимическая характеристика аддитивного взаимодействия галловой кислоты и антибактериального препарата // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. - 2026. - Т. 29, № 4. - С. 92-100.

175. Плотникова Ю. А., Барышева Е. С., Пешков С. А. Химическая модификация противомикробных комплексов органическими молекулами с целью получения смешанно-лигандных антирезистентных агентов // *Технологии живых систем*. - 2023. - Т. 20, № 2. - С. 42-52.

176. Плотникова Ю. А., Барышева Е. С., Пешков С. А. Биохимическая интерпретация синергетического действия биологически активных веществ по отношению к противомикробным средствам методами компьютерной химии // Известия Уфимского научного центра РАН. - 2023. - № 4. - С. 44-50.

177. Пратама М. Р. Ф., Сисвандоно С. Изучение влияния количества запусков Autodock 4 на среднеквадратическое отклонение результатов докинга // Фармация и фармакология. - 2020. - Т. 8, № 6. - С. 476-480.

178. Реутов О. А. Органическая химия: в 4 частях. Часть 2 / О. А. Реутов, А. Л. Курц, К. П. Бутин. - Москва: Лаборатория знаний, 2023. - 623 с.

179. Травень В. Ф. Органическая химия: учебное пособие для вузов: в 3 томах. Том 1 / В. Ф. Травень. - 11-е изд. - Москва: Лаборатория знаний, 2024. - 399 с.

180. Холина Е. Г., Боздаганян М. Е., Страховская М. Г., Коваленко И. Б. Взаимодействие катионных антисептиков с кардиолипидсодержащей модельной бактериальной мембраной // Медицина экстремальных ситуаций. - 2021. - № 3.

181. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2026620726 Российская Федерация. Количественная характеристика показателей вероятности связывания ферментов бактериальных клеток с веществами, обладающими антибактериальными свойствами: заявл. 10.02.2026: опубл. 17.02.2026 / Ю. А. Плотникова, Е. С. Барышева, С. А. Пешков (и др.); заявитель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Оренбургский государственный университет». - EDN UCDHAA.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А1 (а) - Свободная энергия образования комплекса (ΔG), константы ингибирования (K_i), количества водородных связей (h-bond), эффективности

лиганда (LE), общая энергия связывания (ΔE) и номер кластера для комплекса
цефтазидима с РВР 3

Run	h-bond	№ кластера	$\Delta G(\text{cp})$	$K_i (\mu\text{M})$	LE	ΔE	Run	h-bond	№ кластера	$\Delta G(\text{cp})$	$K_i (\mu\text{M})$	LE	ΔE
1	0	IV	-4,73	341,45	-0,13	-2,05	26	1	II	-3,16	4800	-0,09	-2,98
2	2	IV	-3,35	3510	-0,09	-2,25	27	2	V	-3,55	2500	-0,1	-3,05
3	2	III	-3,48	2830	-0,09	-3,2	28	4	III	-3,69	1980	-0,1	-4,39
4	2	II	-2,6	12370	-0,07	-3,75	29	1	III	-3,14	4980	-0,08	-3,09
5	2	III	-3,58	2370	-0,01	-3,64	30	2	V	-3,18	4680	-0,09	-2,34
6	4	II	-5,66	71,48	-0,15	-2,87	31	3	III	-3,25	4120	-0,09	-4,79
7	4	V	-4,83	290,26	-0,13	-3,11	32	2	III	-2,67	10960	-0,07	-3,63
8	1	I	-3,59	2350	-0,1	-1,73	33	4	II	-4,16	886,57	-0,11	-2,95
9	2	V	-3,13	5080	-0,08	-2,41	34	3	III	-4,31	689,21	-0,12	-4,27
10	2	III	-3,95	1280	-0,11	-5,03	35	0	II	-2,79	9070	-0,08	-0,9
11	2	III	-4,56	452,05	-0,12	-4,6	36	2	III	-3,12	5180	-0,08	-3,19
12	3	III	-3,28	3920	-0,09	-4,21	37	3	III	-4,6	424,36	-0,12	-4,9
13	4	III	-4,6	425,57	-0,12	-5,07	38	1	III	-6,15	30,85	-0,17	-3,79
14	2	I	-3,28	3960	-0,09	-1,87	39	3	III	-4,21	815,2	-0,11	-4,29
15	1	II	-2,63	11800	-0,07	-0,97	40	1	IV	-4,02	1130	-0,11	-2,18
16	3	III	-4,6	427,6	-0,12	-4,9	41	3	III	-4,09	1010	-0,11	-4,42
17	2	III	-3,6	2310	-0,1	-5,1	42	1	III	-2,94	7000	-0,08	-3,16
18	2	I	-5,41	108,86	-0,15	-2,89	43	1	II	-3,35	3510	-0,09	-2,01
19	2	II	-3,59	2320	-0,1	-3,21	44	2	V	-3,82	1580	-0,1	-3,42
20	3	II	-3,5	2720	-0,09	-1,89	45	2	IV	-1,73	54180	-0,05	-1,59
21	2	III	-3,6	2310	-0,1	-4,06	46	3	III	-3,47	2860	-0,09	-3,36
22	3	III	-4,44	559,08	-0,12	-4,46	47	2	I	-3,25	4170	-0,09	-2,05
23	0	I	-4,94	240,05	-0,13	-1,92	48	2	IV	-4,71	351,85	-0,13	-2,36
24	3	III	-5,45	101,33	-0,15	-3,76	49	2	III	-3,12	5160	-0,08	-3,59
25	2	III	-4,46	540,63	-0,12	-2,83	50	3	I	-5,08	187,57	-0,14	-2,29

Таблица A1 (b) - Свободная энергия образования комплекса (ΔG), константы ингибирования (K_i), количества водородных связей (h-bond), эффективности лиганда (LE), общая энергия связывания (ΔE) и номер кластера для комплекса
кверцетина с РВР 3

Run	h-bond	№ кла-стера	$\Delta G(\text{сред-нее})$	$K_i(\mu\text{M})$	LE	ΔE	Run	h-bond	№ кла-стера	$\Delta G(\text{сред-нее})$	$K_i(\mu\text{M})$	LE	ΔE
1	1	I	-4,04	1090	-0,18	-0,18	26	3	II	-5,38	114,72	-0,24	-0,25
2	2	IV	-3,82	1590	-0,17	-0,21	27	4	I	-4,59	432,22	-0,21	-0,23
3	0	I	-3,79	1680	-0,17	-0,07	28	1	II	-4,55	461,99	-0,21	-0,11
4	3	II	-4,54	473,3	-0,21	-0,23	29	2	II	-5,27	136,71	-0,24	-0,24
5	1		-4,62	408,47	-0,21	-0,13	30	2		-3,91	1360	-0,18	-0,08
6	3		-3,61	2240	-0,16	-0,26	31	3	II	-5,4	110,68	-0,25	-0,25
7	2	IV	-3,86	1480	-0,18	-0,35	32	1		-3,99	1180	-0,18	-0,26
8	5	I	-4,29	715,84	-0,2	-0,33	33	0	I	-4,08	1030	-0,19	-0,15
9	2	I	-4,46	536,67	-0,2	-0,13	34	2	I	-3,68	2010	0,17	-0,02
10	2	I	-3,97	1240	-0,18	-0,14	35	2		-3,65	2110	-0,17	-0,04
11	1	I	-4,38	613,52	-0,2	-0,17	36	3	I	-4,71	2110	-0,21	-0,28
12	2	IV	-3,79	1660	-0,17	-0,46	37	4	II	-5,47	353,96	-0,25	-0,46
13	3	I	-4,9	256,37	-0,22	-0,22	38	1		-4,39	97,43	-0,2	-0,41
14	3	III	-3,49	2750	-0,16	-0,1	39	2	II	-4,69	604,62	-0,21	-0,3
15	3	I	-4,87	268	-0,22	-0,24	40	2	IV	-4,28	362,83	-0,19	-0,12
16	2		-3,13	5070	-0,14	-0,14	41	1		-3,7	723,32	-0,17	-0,12
17	3	II	-5,4	110,26	-0,25	-0,24	42	4	II	-5,37	1930	-0,24	-0,45
18	2	I	-3,73	1860	-0,17	-0,05	43	0		-4,09	116,6	-0,19	-0,24
19	5	I	-5,01	213,14	-0,23	-0,19	44	4	II	-5,14	1000	-0,23	-0,21
20	4	IV	-4,23	787,22	-0,19	-0,27	45	2	II	-4,59	171,24	-0,21	-0,17
21	3	II	-5,34	120,88	-0,24	-0,24	46	2	II	-4,42	433,43	-0,2	-0,22
22	0	IV	-2,83	8420	-0,13	-0,1	47	2	IV	-3,63	577,39	-0,17	-0,15
23	2	I	-4,15	901,3	-0,19	-0,12	48	4	V	-4,26	2170	-0,19	-0,13
24	1	I	-3,95	1270	-0,18	-0,23	49	1	V	-3,2	752,22	-0,15	-0,14
25	1		-4,05	1070	-0,18	-0,15	50	2	I	-4,65	4520	-0,21	-0,3

Таблица A1 (с) - Свободная энергия образования комплекса (ΔG), константы ингибирования (K_i), количества водородных связей (h-bond), эффективности лиганда (LE), общая энергия связывания (ΔE) и номер кластера для комплекса галловой кислоты с РВР 3

Run	h-bond	№ кла-стера	$\Delta G(\text{cp})$	$K_i(\mu\text{M})$	LE	ΔE	Run	h-bond	№ кла-стера	$\Delta G(\text{cp})$	$K_i(\mu\text{M})$	LE	ΔE
-----	--------	-------------	-----------------------	--------------------	----	------------	-----	--------	-------------	-----------------------	--------------------	----	------------

1	3	III	-3,44	3010	-0,29	-3,21	26	4	III	-3,65	2100	-0,3	-2,9
2	4	III	-3,44	3000	-0,29	-3,31	27	3	III	-3,41	3150	-0,28	-3,06
3	4	III	-3,54	2560	-0,29	-2,34	28	2	II	-3,44	2990	-0,29	-1,65
4	4	III	-3,68	2010	-0,31	-2,27	29	2	V	-3,12	5150	-0,26	-1,3
5	4	III	-3,27	4000	-0,27	-3,38	30	4	III	-3,46	2900	-0,29	-3,2
6	3	III	-3,65	2100	-0,3	-2,36	31	2	IV	-3,18	4630	-0,27	-1,96
7	4	III	-3,41	3160	-0,28	-2,2	32	2	III	-3,36	3430	-0,28	-3,07
8	4	III	-3,57	2410	-0,3	-2,24	33	3	III	-3,61	2250	-0,3	-2,43
9	3	III	-3,36	3430	-0,38	-2,96	34	4	III	-3,48	2800	-0,29	-2,34
10	4	III	-3,31	3760	-0,28	-3,46	35	2	III	-3,24	4190	-0,27	-3,06
11	3	III	-3,5	2740	-0,29	-3,12	36	4	III	-3,57	2400	-0,3	-2,11
12	3	III	-3,48	2800	-0,29	-3,1	37	4	III	-3,34	3550	-0,28	-3,47
13	4	III	-3,36	3450	-0,28	-3,24	38	3	III	-3,34	3540	-0,28	-2,99
14	3	III	-3,35	3530	-0,28	-3,11	39	3	III	-3,43	3070	-0,29	-3,1
15	2	III	-3,13	5060	-0,26	-3,38	40	3	III	-3,36	3450	-0,28	-2,68
16	3	III	-3,45	2950	-0,29	-2,29	41	3	I	-3,56	2480	-0,3	-1,45
17	3	III	-3,4	3200	-0,28	-3,21	42	2	III	-3,49	2790	-0,29	-2,52
18	3	III	-3,36	3470	-0,28	-3,1	43	3	III	-3,19	4580	-0,27	-3,07
19	3	III	-3,26	4080	-0,27	-3,13	44	3	III	-3,36	3450	-0,28	-2,72
20	3	III	-3,33	3630	-0,28	-2,23	45	3	III	-3,47	2850	-0,29	-2,25
21	4	III	-3,62	2240	-0,3	-2,43	46	4	III	-3,56	2480	-0,3	-2,22
22	1	III	-3,48	2820	-0,29	-1,78	47	2	III	-3,77	1730	-0,31	-2,55
23	3	III	-3,36	3460	-0,28	-3,07	48	4	III	-3,59	2350	-0,3	-2,15
24	3	III	-3,59	2350	-0,3	-2,27	49	2	III	-3,51	2680	-0,29	-2,34
25	3	III	-3,21	4440	-0,27	-3,25	50	2	III	-3,64	2150	-0,3	-2,4

Таблица A1 (d) - Свободная энергия образования комплекса (ΔG), константы ингибирования (K_i), количества водородных связей (h-bond), эффективности лиганда (LE), общая энергия связывания (ΔE) и номер кластера для комплекса рутинина с РВР 3

Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (uM)	LE	ΔE	Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (uM)	LE	ΔE
1	4	IV	-1,03	175930	-0,02	-0,59	26	1	II	-0,8	258650	-0,02	-0,4

2	1	III	-0,4	508870	-0,01	-0,15	27	1	I	-0,47	448680	-0,01	-0,13
3	1		0,19		0	-0,14	28	2	II	0,56		-0,01	-0,27
4	0	IV	1,39		-0,03	-0,01	29	1	III	0,96		-0,02	-0,19
5	1		0,86		-0,02	-0,31	30	2		-0,74	286840	-0,02	-0,25
6	0		0,33		-0,01	-0,15	31	2	I	-0,15	771990	0	-0,2
7	2	II	0,5		-0,01	-0,22	32	1	V	-1,08	160690	-0,03	-0,27
8	1	I	0,91		-0,02	-0,1	33	4		0,17		0	-0,64
9	1	I	1,17		-0,03	-0,16	34	0	III	1,76		-0,04	-0,11
10	2	IV	0,3		-0,01	-0,09	35	1	I	1,56		-0,04	-0,21
11	0	II	-0,12	813490	0	-0,32	36	0	IV	0,88		-0,02	0
12	0	V	0,11		0	-0,17	37	0	IV	0,68		-0,02	-0,01
13	1	I	1,12		-0,03	-0,13	38	1		0,17		0	-0,07
14	0	IV	0,44		-0,01	-0,34	39	0		1,28		-0,03	-0,15
15	2	IV	2,33		-0,05	-0,12	40	1		-0,35	556980	-0,01	-0,1
16	2	II	0,3		-0,01	-0,19	41	1		-0,32	587300	-0,01	-0,11
17	2	I	1		-0,02	-0,18	42	2		2,37		-0,06	-0,25
18	1	IV	0,47		-0,01	-0,1	43	3	V	-2,05	31420	-0,05	-0,25
19	1		0,04		0	-0,31	44	0		0,98		-0,02	-0,01
20	1		1,33		-0,03	-0,22	45	2	II	0,72		-0,02	-0,1
21	0	IV	1,37		-0,03	-0,14	46	1		1,3		-0,03	0
22	3	II	-0,49	441020	-0,01	-0,33	47	2	II	0,87		-0,02	-0,12
23	3	III	0,84		-0,02	-0,23	48	1	II	0,89		-0,02	-0,17
24	1		1,97		-0,05	-0,05	49	2		2,48		-0,06	-0,06
25	0	II	0,14		0	-0,08	50	0		0,71		-0,02	-0,17

Таблица A2 (а) - Свободная энергия образования комплекса (ΔG), константы ингибирования (K_i), количества водородных связей (h-bond), эффективности лиганда (LE), общая энергия связывания (ΔE) и номер кластера для комплекса цефтазидима с β -лактамазой BlaZ

Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (μM)	LE	ΔE	Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (μM)	LE	ΔE
1	4	V	-6,85	9,57	-0,19	-5,09	26	5		-9,12	0,21	-0,25	-5,14

2	4		-6,02	38,7	-0,16	-6,07	27	5	III	-9,29	0,16	-0,25	-5,21
3	3		-7,42	3,63	-0,2	-5,37	28	3	V	-5,87	50,08	-0,16	-5
4	3	V	-5,3	131,32	-0,14	-5,53	29	4	V	-8,41	0,68	-0,23	-6,31
5	2		-6,5	17,15	-0,18	-4,07	30	2	I	-5,19	155,93	-0,14	-3,22
6	5	V	-8,52	0,57	-0,23	-6,37	31	3	V	-5,88	49,16	-0,16	-4,55
7	2	V	-7,05	6,77	-0,1	-4,34	32	1		-6,43	19,44	-1,17	-5,78
8	4	III	-5,22	148,68	-0,14	-2,84	33	3	V	-4,79	305,95	-0,13	-3,07
9	3	I	-5,06	195,27	-0,14	-2,52	34	3	II	-6,84	9,74	-0,18	-2,5
10	1	V	-7,09	6,34	-0,19	4,23	35	3	V	-6,18	29,46	-0,17	-6,77
11	4	V	-5,14	170,77	-0,14	-5,54	36	4	V	-6,19	28,81	-0,17	-5,23
12	4	V	-8,48	0,61	-0,23	-6,44	37	2	V	-6,83	9,8	-0,18	-4,84
13	4	V	-6,51	16,78	-0,18	-4,98	38	3	V	-6,38	21,13	-0,17	-5,37
14	2	III	-5,67	69,23	-0,15	-1,38	39	3	V	-8,43	0,66	-0,23	-6,7
15	4	V	-7,05	6,79	-0,19	-5,68	40	2	V	-5,55	86,08	-0,15	-4,55
16	4		-8,43	0,67	-0,23	-4,98	41	3	I	-6,54	16,15	-0,18	-2,93
17	2	V	-6,2	28,49	-0,17	-5,23	42	4	V	-7,27	4680	-0,2	-5,4
18	3		-6,91	8,64	-0,19	-4,93	43	3	V	-6,37	21,33	-0,17	-5,77
19	5	V	-8,58	0,51	-0,23	-6,35	44	1	V	-6,65	13,44	-0,18	-4,6
20	1	V	-6,66	13,16	-0,18	-3,52	45	2	V	-7,75	2,08	-0,21	-5,77
21	3	V	-5,89	48,06	-0,16	-5,37	46	2	V	-5,62	76,15	-0,15	-3,38
22	4		-7,82	1,84	-0,21	-5,14	47	2	V	-6,12	32,57	-0,17	-5,57
23	2	V	-5,36	118,25	-0,14	-5,82	48	4	V	-5,84	52,11	-0,16	-5,06
24	3	V	-7,19	5,39	-0,19	-6,56	49	3	V	-7,18	5,42	-0,19	-4,02
25	3	V	-7,33	4,24	-0,2	-5,31	50	3	V	-5,68	68,77	-0,15	-3,08

Таблица A2 (b) - Свободная энергия образования комплекса (ΔG), константы ингибирования (K_i), количества водородных связей (h-bond), эффективности лиганда (LE), общая энергия связывания (ΔE) и номер кластера для комплекса кверцетина с β -лактамазой BlaZ

Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (μM)	LE	ΔE	Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (μM)	LE	ΔE
1	5	IV	-4,94	237,99	-0,22	-0,16	26	2	I	-5,23	146,43	-0,24	-0,19
2	6	IV	-5,61	76,76	-0,26	-0,15	27	3		-4,68	373,79	-0,21	-0,23

3	3	I	-5,76	60,09	-0,26	-0,42	28	4	I	-6,32	23,13	-0,29	-0,28
4	4	III	-4,54	473,34	-0,21	-0,2	29	4	III	-5,05	198,17	-0,23	-0,54
5	2	V	-4,52	489,98	-0,21	-0,31	30	4	II	-5,61	77,38	-0,26	-0,42
6	4	I	-6,35	22,1	-0,29	-0,29	31	3	I	-5,76	60,21	-0,26	-0,42
7	2	I	-5,46	100,04	-0,25	-0,22	32	4	IV	-4,44	557,52	-0,2	-0,34
8	5	V	-5,87	49,91	-0,27	-0,36	33	3	V	-4,81	299,97	-0,22	-0,31
9	3	III	-5,01	211,86	-0,23	-0,52	34	4	I	-6,29	24,57	-0,29	-0,28
10	5	III	-5,11	179,34	-0,23	-0,57	35	5	IV	-5,28	134,11	-0,24	-0,33
11	4	IV	-4,85	279,5	-0,22	-0,46	36	3	II	-5,6	78,8	-0,25	-0,4
12	2	IV	-4,75	331,17	-0,22	-0,29	37	4	III	-5,52	90,44	-0,25	-0,31
13	3	I	-5,56	83,94	-0,25	-0,31	38	4	III	-5,6	79,15	-0,25	-0,33
14	4	I	-5,57	83,07	-0,25	-0,49	39	3	II	-5,04	203,64	-0,23	-0,36
15	2	IV	-5,26	140,49	-0,24	-0,39	40	5	I	-6,4	20,52	-0,29	-0,24
16	4	I	-5,72	64,09	-0,26	-0,39	41	5	II	-5,34	122,52	-0,24	-0,45
17	4	III	-5,53	88,59	-0,25	-0,3	42	4		-5,26	140,14	-0,24	-0,6
18	4		-5,61	77,45	-0,26	-0,23	43	0	III	-5,01	214,4	-0,23	-0,17
19	3	I	-5,04	201,44	-0,23	-0,35	44	3	II	-5,23	147,84	-0,24	-0,44
20	3	IV	-5,07	191,82	-0,24	-0,36	45	2	III	-5,23	146,64	-0,24	-0,55
21	4	II	-5,3	130,71	-0,27	-0,32	46	5	I	-6,35	22,07	-0,29	-0,31
22	4	III	-5,93	45,13	-0,21	-0,55	47	3	III	-5,55	85,49	-0,25	-0,34
23	3	I	-4,65	393,56	-0,21	-0,22	48	3	III	-5,15	166,86	-0,23	-0,49
24	3	V	-5,1	181,8	-23	-0,49	49	3	I	-4,7	357,55	-0,21	-0,38
25	4		-4,66	384,62	-0,21	-0,61	50	2	III	-5,26	138,75	-0,24	-0,56

Таблица A2 (с) - Свободная энергия образования комплекса (ΔG), константы ингибирования (K_i), количества водородных связей (h-bond), эффективности лиганда (LE), общая энергия связывания (ΔE) и номер кластера для комплекса галловой кислоты с β -лактамазой BlaZ

Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (uM)	LE	ΔE	Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (uM)	LE	ΔE
1	4	III	-5,99	40,86	0,5	-1,91	26	4	III	-5,74	62,33	-0,48	-3,21
2	3	III	-5,76	59,79	-0,48	-3,3	27	5		-5,87	49,7	-0,49	-1,85
3	2	V	-5,02	207,37	-0,42	-3,39	28	3	III	-6,12	32,62	-0,51	-3,5

4	5	III	-6,13	32,19	-0,51	-3,48	29	3	III	-6,1	33,87	-0,51	-3,5
5	3	III	-6,01	39,16	-0,5	-3,38	30	5	III	-5,97	42,16	-0,15	-1,92
6	2		-5,03	204,81	-0,42	-3,76	31	4	III	-5,99	40,36	-0,5	-1,93
7	5	I	-5,14	170,01	-0,43	-1,31	32	3	III	-5,42	106,06	-0,45	-1,44
8	3	III	-6,13	31,92	-0,51	-3,34	33	4	III	-6,07	35,47	-0,51	-3,36
9	4	III	-6,01	39,19	-0,5	-1,89	34	4	III	-6,15	31,15	-0,51	-3,31
10	3	III	-6,11	33,14	-0,51	-3,43	35	3	III	-4,65	391,03	-0,39	-1,66
11	3	III	-6,02	38,47	-0,5	-3,47	36	1		-4,84	285,45	-0,4	-3,92
12	3	III	-6,05	36,84	-0,5	-3,42	37	4		-5,98	41,58	-0,5	-1,95
13	4		-5,79	56,74	-0,48	-3,19	38	3	III	-6,14	31,55	-0,51	-3,47
14	5	II	-5,49	95,15	-0,46	-3,01	39	3	III	-6,09	34,24	-0,51	-3,47
15	2		-5,04	202,4	-0,42	-3,78	40	4	III	-5,68	68,23	-0,47	-2,12
16	4	II	-5,98	41,46	-0,5	-3,02	41	5		-5,87	49,84	-0,49	-1,77
17	5	III	-6,02	38,9	-0,5	-3,51	42	3	III	-6,05	36,54	-0,5	-3,37
18	3	III	-6,14	31,35	-0,51	-3,3	43	4	V	-4,89	261,72	-0,41	-2,95
19	4		-5,51	91,13	-0,46	-1,65	44	5		-6,04	37,33	-0,5	-2
20	3	III	-6,02	38,42	-0,5	-3,11	45	4	III	-6,09	34,56	-0,51	-5,38
21	5	III	-6,1	33,71	-0,51	-3,54	46	3	III	-6,12	32,7	-0,51	-3,32
22	5	V	-5,1	183,67	-0,42	-1,36	47	4		-6,02	38,97	-0,5	-1,94
23	5	III	-6,11	33,19	-0,51	-3,43	48	4	I	-4,95	234,38	-0,41	-1,12
24	5		-5,61	77,88	-0,47	-3,76	49	3	III	-6,13	31,94	-0,51	-3,56
25	4	III	-6,12	32,87	-0,51	-3,41	50	5		-6,02	38,68	-0,5	-2

Таблица A2 (d) - Свободная энергия образования комплекса (ΔG), константы ингибирования (K_i), количества водородных связей (h-bond), эффективности лиганда (LE), общая энергия связывания (ΔE) и номер кластера для комплекса рутина с β -лактамазой BlaZ

Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (uM)	LE	ΔE	Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (uM)	LE	ΔE
1	3		-2,52	14100	-0,06	-0,16	26	5	III	-2,2	24480	-0,05	-0,26
2	4	III	-2,72	10180	-0,06	-0,25	27	3	III	-1,44	88020	-0,03	-0,2
3	3	III	-3,31	3730	-0,8	-0,55	28	3		-3,28	3950	-0,08	-0,25
4	3	IV	-3,77	1720	-0,09	-0,16	29	2	IV	-0,7	307830	-0,02	-0,14
5	2	III	-4,53	478,33	-0,11	-0,38	30	5	I	-2,83	8390	-0,07	-0,49
6	3	III	-0,36	548,23	-0,1	-0,29	31	5	V	-1,81	47280	-0,04	-0,78

7	1	III	-1,04	173,7	-0,02	-0,08	32	4	IV	-2,89	7680	-0,07	-0,37
8	2	III	-1,85	43820	-0,04	-0,29	33	3	III	-1,49	80900	-0,03	-0,46
9	1		-0,63	347,63	-0,01	-0,43	34	1	III	-1,48	81650	-0,03	-0,19
10	2		-3,01	6200	-0,07	-0,48	35	3		-0,01	980810	0	-0,45
11	3		-1,06	167980	-0,02	-0,14	36	4		-3,75	1790	-0,09	-0,57
12	2	III	-1,72	55290	-0,04	-0,53	37	5	I	-2,4	17540	-0,06	-0,45
13	2		-2,49	14960	-0,06	-0,4	38	5	V	-4,23	792,03	-0,1	-0,48
14	5	III	-3,83	1570	-0,09	-0,89	39	4	III	-2,12	27930	-0,05	-0,53
15	2	I	-2,58	12770	-0,06	-0,06	40	3	III	-1,13	148130	-0,03	-0,41
16	5	I	-2,87	7890	-0,07	-0,75	41	2	V	0,05	0	0	-0,14
17	2		-1,07	165,46	-0,02	-32	42	3	V	-0,07	894880	0	-0,19
18	4	I	-1,68	58650	-0,04	-0,56	43	2	IV	-1,42	90640	-0,03	-0,18
19	3		-1,6	66780	-0,04	-0,55	44	3	IV	-1,87	42540	-0,04	-0,6
20	1	IV	-1,01	180370	-0,02	-0,08	45	5	I	-2,78	9160	-0,06	-0,38
21	3		-1,77	50250	-0,04	-0,22	46	2		-1,28	114510	-0,03	-0,43
22	4	V	-2,11	28320	-0,05	-0,62	47	1		-1,39	96360	-0,03	-0,21
23	2	III	-2,95	6840	-0,07	-0,24	48	2		-0,03	943400	0	-0,66
24	4	III	-4,02	1140	-0,09	-0,9	49	1	III	-1,15	143890	-0,03	-0,41
25	2	III	-1,25	12860	-0,03	-0,08	50	2	III	-0,96	197350	-0,02	-0,36

Таблица А3 (а) - Свободная энергия образования комплекса (ΔG), константы ингибирования (K_i), количества водородных связей (h-bond), эффективности лиганда (LE), общая энергия связывания (ΔE) и номер кластера для комплекса цефтазидима с β -лактамазой OXA-10

Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (uM)	LE	ΔE	Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (uM)	LE	ΔE
1	2		-2,96	6777	-0,08	-2,94	26	1	I	-2,23	23390	-0,06	-1,61
2	2		-3,46	2890	-0,09	-3,55	27	1		-2,39	17760	-0,06	-1,57
3	1	I	-2,15	25560	-0,06	-1,91	28	3		-3,29	3890	-0,09	-1,14
4	3		-3,11	5260	-0,08	-3,16	29	1	I	-2,36	18550	-0,06	-2,9

5	2		-2,66	11300	-0,07	-3,77	30	2		-4,85	280,31	-0,13	-3,93
6	3		-3,58	2380	-0,1	-3,09	31	1		-2,15	26400	-0,06	-1,9
7	2		-3,56	2480	-0,1	-2,74	32	2		-1,85	44420	-0,05	2,88
8	2		-2,74	9770	-0,07	-2,6	33	0		-2,24	22860	-0,06	-2,71
9	1		-1,99	34690	-0,05	-3,34	34	2		-3,45	2960	-0,09	-2,68
10	1		-4,09	996,56	-0,11	-3,58	35	2		-2,28	21200	-0,06	-4,01
11	2		-2,46	15800	-0,07	-2,22	36	1	IV	-4,39	609,01	-0,12	-1,99
12	2		-2,16	26240	-0,06	-3,63	37	1	I	-1,82	46320	-0,05	-0,65
13	2		-2,91	7320	-0,08	-1,91	38	3		-4,34	658,23	-0,12	-3,62
14	2		-2,21	24060	-0,06	-2,26	39	2		-3,96	1260	-0,11	-3,17
15	1		-3,03	6000	-0,08	-2,69	40	2		-3,59	2330	-0,1	-3,65
16	2	V	-2,83	8390	-0,08	-2,44	41	2		-2,79	9050	-0,08	-3,81
17	3		-3,85	1520	-0,01	-2,97	42	1		-1,47	83470	-0,04	-2,96
18	2		-0,37	1930	-0,1	-2,21	43	2	V	-1,67	59970	-0,05	-1,13
19	2		-3,41	3150	-0,09	-3,45	44	1	IV	-2,72	10220	-0,07	-1,54
20	2		-2,26	22230	-0,06	-2,06	45	1	I	-2,64	11530	-0,07	-1,79
21	1		-2,7	10510	-0,07	-3,38	46	3		-2,08	29830	-0,06	-1,69
22	3		-2,44	16270	-0,07	-2,75	47	1		-1,58	69250	-0,04	-0,33
23	3		-3,55	2490	-0,1	-2,65	48	1		-3,61	2250	-0,1	-3,43
24	2	V	-2,8	8820	-0,08	-2,01	49	2		-2,91	7300	-0,08	-1,7
25	2		-2,57	13070	-0,07	-2,04	50	1		-2,78	9220	-0,08	-2,48

Таблица А3 (b) - Свободная энергия образования комплекса (ΔG), константы ингибирования (K_i), количества водородных связей (h-bond), эффективности лиганда (LE), общая энергия связывания (ΔE) и номер кластера для комплекса кверцетина с β -лактамазой OXA-10

Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (uM)	LE	ΔE	Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (uM)	LE	ΔE
1	2		-4,21	817,16	-0,19	-0,19	26	1		-3,6	2310	-0,16	-0,14
2	1		-3,75	1780	-0,17	-0,09	27	1		-3,61	2240	-0,16	-0,11
3	1		-4,67	375,17	-0,21	-0,28	28	1		-3,18	4670	-0,14	-0,29
4	2		-3,51	2690	-0,16	-0,21	29	1		-5,19	155,61	-0,24	-0,39
5	3	II	-4,36	639,01	-0,2	-0,27	30	2		-3,72	1870	-0,17	-0,31
6	2		-4,16	891,56	-0,19	-0,46	31	1		-4,62	407,79	-0,21	-0,19
7	1		-4,44	557,5	-0,2	-0,27	32	2	IV	-3,97	1240	-0,18	-0,05

8	1		-3,5	2700	-0,16	-0,07	33	2		-3,62	2220	-0,16	-0,11
9	2	IV	-3,87	1460	-0,18	-0,09	34	2		-4,11	969,45	-0,19	-0,13
10	2	IV	-3,59	2330	-0,16	-0,18	35	2		-5,23	145,96	-0,24	-0,45
11	1		-3,5	2710	-0,16	-0,16	36	2		-4,34	657,06	-0,2	-0,08
12	2		-4,15	914,48	-0,19	-0,24	37	2	II	-3,91	1370	-0,18	-0,09
13	1		-4,77	321,09	-0,22	-0,38	38	2		-3,7	1940	-0,17	-0,11
14	3	I	-3,76	1770	-0,17	-0,13	39	3		-4,45	543,78	-0,2	-0,28
15	2		-3,94	1290	-0,18	-0,45	40	2	I	-3,73	1830	-0,17	-0,24
16	2		-5,18	160,37	-0,24	-0,41	41	1	II	-3,27	4020	-0,15	-0,01
17	3		-4,44	557,84	-0,2	-0,3	42	2	I	-3,68	1990	-0,17	-0,16
18	3		-5,02	207,61	-0,23	-0,21	43	2	III	-3,37	3380	-0,15	-0,28
19	2		-3,24	4240	-0,15	-0,32	44	2		-2,98	6520	-0,14	-0,14
20	2		-4,9	257,06	-0,22	-0,08	45	2	I	-3,44	3030	-0,16	-0,63
21	1		-5,27	138,2	-0,24	-0,43	46	2		-4,43	561,92	-0,2	-0,25
22	3		-3,55	2520	-0,16	-0,28	47	2		-3,78	1700	-0,17	-0,16
23	1		-3,3	3800	-0,15	-0,18	48	4		-3,82	1590	-0,17	-0,23
24	2	IV	-3,79	1670	-0,17	-0,23	49	1		-5,22	150,28	-0,24	-0,44
25	1		-3,69	1980	-0,17	-0,36	50	2		-3,92	1340	-0,18	-0,26

Таблица А3 (с) - Свободная энергия образования комплекса (ΔG), константы ингибирования (K_i), количества водородных связей (h-bond), эффективности лиганда (LE), общая энергия связывания (ΔE) и номер кластера для комплекса галловой кислоты с β -лактамазой ОХА-10

Run	h-bond	№ кластера	$\Delta G(\text{cp})$	$K_i(\text{uM})$	LE	ΔE	Run	h-bond	№ кластера	$\Delta G(\text{cp})$	$K_i(\text{uM})$	LE	ΔE
1	3		-3,25	4180	-0,27	-1,33	26	2		-3,81	1610	-0,32	-2,29
2	2	I	-3,54	2550	-0,29	-1,85	27	2		-3,55	2500	-0,3	-1,28
3	3		-3,54	2550	-0,29	-1,38	28	4		-3,26	4090	-0,27	-2,02
4	3	I	-3,71	1920	-0,31	-1,8	29	4		-2,91	7330	-0,24	-2,2
5	2	I	-4,1	990,76	-0,34	-1,62	30	4		-3,41	3160	-0,28	-2,36
6	2		-3,3	3810	-0,27	-2,21	31	3	IV	-3,62	2230	-0,3	-2,38
7	2		-3,27	3990	-0,27	-1,39	32	3	I	-3,48	2790	-0,29	-1,83

8	2		-3,25	4130	-0,27	-1,32	33	3		-3,76	1750	-0,31	-2,45
9	3		-3,01	6200	-0,25	-2,18	34	3		-3,34	3590	-0,28	-2,37
10	3		-3,11	5220	-0,26	-2,05	35	4		-3,4	3210	-0,28	-2,26
11	3		-3,04	5870	-0,25	-0,89	36	2	I	-4,2	831,4	-0,35	-1,73
12	3		-3,46	2900	-0,29	-2,38	37	3		-3,56	2470	-0,3	-2,21
13	3	V	-3,96	1240	-0,33	-2,37	38	3		-3,55	2490	-0,3	-2,2
14	3		-2,93	7100	-0,24	-1,77	39	1	I	-3,28	3920	-0,27	-1,34
15	3		-3,06	5730	-0,26	-2,15	40	3	V	-3,16	4830	-0,26	-1,79
16	4		-3,14	4960	-0,26	-1,92	41	3	IV	-3,55	2490	-0,3	-2,4
17	2		-4,15	909,34	-0,35	-2,79	42	2	IV	-3,36	3450	-0,28	-1,57
18	2		-2,95	6840	-0,25	-1,65	43	2	I	-3,4	3240	-0,28	-1,63
19	1	IV	-3,76	1750	-0,31	-1,71	44	4		-3,34	3560	-0,28	-2,02
20	1		-2,9	7430	-0,24	-1,43	45	1		-3,64	2140	-0,3	-1,34
21	4		-3,29	3870	-0,27	-2,13	46	3		-3,32	3700	-0,28	-2,23
22	2	I	-4,19	855,1	-0,35	-1,72	47	4		-3,25	4120	-0,27	-2,26
23	3		-4,06	1060	-0,34	-2,76	48	4		-3,62	2230	-0,3	-1,56
24	4	IV	-3,15	4950	-0,26	-1,15	49	4		-3,44	3020	-0,29	-2,28
25	3		-3,09	5410	-0,26	-2,06	50	2		-3,92	1340	-0,33	-2,53

Таблица А3 (d) - Свободная энергия образования комплекса (ΔG), константы ингибирования (K_i), количества водородных связей (h-bond), эффективности лиганда (LE), общая энергия связывания (ΔE) и номер кластера для комплекса рутина с β -лактамазой ОХА-10

Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (uM)	LE	ΔE	Run	h-bond	№ кластера	ΔG (ср)	K_i (uM)	LE	ΔE
1	1		2,27		0,05	-0,02	26	3		0,05		0	-0,38
2	3		0,3		0,01	-0,61	27	0		0,64		0,01	-0,02
3	3	IV	1,32		0,03	-0,3	28	2		1,06		0,02	-0,31
4	0		-0,58	374,03	-0,01	-0,15	29	0		1,95		0,05	-0,03
5	1		1,41		0,03	-0,18	30	1		-0,25	657450	-0,01	-0,13
6	1	IV	0,93		0,02	-0,1	31	0		1,38		0,03	-0,13
7	0		-0,29	611,92	-0,01	-0,14	32	1		-0,85	237890	-0,02	-0,06
8	0	IV	1,32		0,03	-0,02	33	1		0,06		0	-0,12

9	1		0,09		0	-0,36	34	1		1,33		0,03	-0,18
10	1	IV	1,88		0,04	-0,22	35	1	I	1,1		0,03	-0,17
11	1		1,72		0,04	-0,41	36	1		1,31		0,03	-0,07
12	1		1,29		0,03	-0,01	37	2	IV	0,34		0,01	-0,33
13	1		0,03		0	-0,38	38	0		0,82		0,02	-0,05
14	1		2,95		0,07	-0,03	39	2	IV	2,63		0,06	-0,55
15	1		0,94	206190	-0,02	-0,14	40	2		-3,5	2,73	-0,08	-0,4
16	1		1,03		0,02	0,04	41	0		0,93		0,02	-0,26
17	2		0,02		0	-0,14	42	3		-0,11	829270	0	-0,5
18	2		0,83		0,02	-0,57	43	2		2,08		0,05	-0,19
19	2		0,87		0,02	-0,06	44	1		-2,75	9700	-0,06	-0,34
20	2		1,72		0,04	-0,42	45	2		0,78		0,02	-0,21
21	1		1,61		0,04	0,03	46	1		0,91		0,02	-0,36
22	1		1,47		0,03	-0,16	47	0		0,97		0,02	-0,07
23	0		0,91		0,02	-0,04	48	3		-0,09	863070	0	-0,32
24	0		1,28		0,03	-0,05	49	0	IV	1,84		0,04	-0,1
25	2	IV	1,69		0,04	-0,13	50	1		1,19		0,03	-0,34

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

«УТВЕРЖДАЮ»
Ректор ФГБОУ ВО «ОрГМУ»
Минздрава России,
отличник здравоохранения РФ,
д.м.н., профессор
И.В. Мирошниченко
«17» 09 2026 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов кандидатской диссертации
Плотниковой Юлии Александровны на тему: «Биохимические аспекты стабилизации белок-лигандных комплексов и модуляции активности ключевых белков-мишеней: пенициллин-связывающего белка и β -лактамаз» по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки) в учебную работу кафедры фармацевтической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Комиссия в составе: заведующий кафедрой, д.б.н., доцент Михайлова И.В.; д.м.н., доцент Иванова Е.В.; к.б.н., доцент Винокурова Н.В. подтверждает использование результатов, полученных Плотниковой Юлией Александровной в ходе работы над кандидатской диссертацией «Биохимические аспекты стабилизации белок-лигандных комплексов и модуляции активности ключевых белков-мишеней: пенициллин-связывающего белка и β -лактамаз», на кафедре фармацевтической химии в рамках изучения студентами фармацевтического факультета дисциплин «Биологическая химия» и «Применение нанотехнологий в создании новых лекарственных препаратов».

Заведующий кафедрой, д.б.н., доцент

Михайлова И.В.

Доцент кафедры, д.м.н., доцент

Иванова Е.В.

Доцент кафедры, к.б.н., доцент

Винокурова Н.В.

ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России
ПОДПИСИ ЗАВЕРЯЮ:
Начальник отдела кадров
Е.Н. Бердникова